

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización funcional de genes
implicados en la transformación maligna del
compartimento linfocitario**

RAÚL JIMÉNEZ PÉREZ

Madrid, 2013

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización funcional de genes
implicados en la transformación maligna del
compartimento linfocitario**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Raúl Jiménez Pérez

Licenciado en Biología y Bioquímica, para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

DIRECTOR DE TESIS

MIGUEL R. CAMPANERO GARCÍA



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Departamento de Bioquímica

Instituto de Investigaciones biomédicas “Alberto Sols”

CSIC-UAM



MINISTERIO DE
ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CSIC

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"



Don Miguel R. Campanero García, Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM)

CERTIFICA

Que D. Raúl Jiménez Pérez, Licenciado en Biología y en Bioquímica por la Universidad de Córdoba y Máster en Biomedicina Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título

"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GENES IMPLICADOS EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA DEL COMPARTIMENTO LINFOCITARIO".

Considero que este trabajo es satisfactorio y apto para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid a 28 de agosto de 2013.

Fdo.: Miguel R. Campanero
Científico Titular CSIC

VºBº Tutor: Paloma Martín Sanz
Investigadora Científica CSIC

*"Como el camino está sembrado de espinas,
Dios ha dado al hombre tres dones:
la sonrisa, el sueño, y la esperanza"*
(Immanuel Kant)

*"Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir"*
(T.S. Elliot)

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos bisabuelos:

Juan Gutiérrez Gámiz y Presentación León Triguero

Recuerdo el día en el que me comunicaron que dispondría de una beca para hacer lo que siempre había soñado, fue uno de los días más felices de mi vida. Sin embargo, no tenía ni idea del largo camino que estaba a punto de empezar. Se suele decir que todos los comienzos son difíciles... a mí me tocó empezar dos veces. El camino ha sido duro, lleno de obstáculos y aunque a veces estuve a punto de tirar la toalla, siempre ha habido alguien especial que me ha animado a continuar.

En estos años, además de los inconvenientes, también he disfrutado mucho de mi trabajo, donde he podido conocer a personas que sin su ayuda nunca hubiera conseguido recorrer el camino que me ha llevado a conseguir esta tesis. A todas estas personas les dedico este agradecimiento.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a Miguel por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis en su laboratorio, por su paciencia y comprensión, por su disponibilidad, su visión y rigurosidad científica, por enseñarme, por su implicación en la elaboración de esta tesis... pero sobre todo, por su voto de confianza cuando las cosas se pusieron feas y pocos apostaban por mí, gracias.

Me gustaría dar las gracias a mis compañeros de laboratorio Yuri Chiodo ("grazie mille") y María Sanz ("mil gracias oh") por su positividad frente a las adversidades y por ser tan trabajadores. Nunca olvidaré las risas que hemos compartido en el laboratorio... "María!! recuerda que lo que hay que meter en la máquina de revelado es una película de rayos x y no el cartón que las protege!!!" (aún así... parece que se ven las bandas... jajaja) muchas gracias chicos!.

A Teresa Iglesias y a su grupo por ayudarme con el northernblot y con los préstamos de material científico (menudo tráfico de mercancías).

A Juan Miguel Redondo y su grupo por permitirme asistir a sus seminarios y sobre todo por aportar ideas y comentarios sobre mi trabajo. Quiero agradecer especialmente a Nerea su dedicación para la puesta a punto del Tissue Microarray (paramos ya la reacción?? ahora? ahora? y ahora?).

Mi agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de una beca FPI que permitió la elaboración de ésta tesis.

A mis amigos de Baena: Dulce, Eva Guijarro, Rafa Torres, Jesús Quintero, Domingo villa "El Domi", Loli, Eva Ortega y "Tito"... que aunque ya no nos veamos como antaño sigo acordándome de todos vosotros. Gracias por compartir grandes momentos de mi vida y haber sabido estar ahí. También me gustaría dar las gracias a los chicos del grupo de teatro "Amikitia" especialmente a Pedro, Rosa y Reyes por ser tan buenos conmigo y por apoyarme en mis proyectos... teníais razón, al final lo conseguí!!.

A mi amigo, gran amigo, David Rodríguez, por tu apoyo incondicional y por dejarme poner a prueba tu paciencia con mis largas charlas sobre ciencia. Siempre me has hecho reír y has tenido una palabra de ánimo. Gracias por todo, sin ti no lo hubiera conseguido.

A mi gran amiga Marisol, por ayudarme en todo lo que ha estado en tu mano, por ser amiga y compañera durante la carrera. Por ser tan profesional y luchadora (llegarás a ser una gran científica). No hay nadie como tú!!.

A mi amigo Juan, por tu apoyo y ayuda en la última etapa de mi tesis, por hacerme ver que lo más importante de la vida son los valores y el tiempo. Aunque ahora no estés atravesando una buena racha, ya sabes que todo cambia. Estoy seguro de que llegarás muy lejos, ánimo!!.

A todo el personal del IIB, en especial a los que han contribuido a este trabajo, por ser tan buenos compañeros y por vuestra ayuda.

Mi más sentido agradecimiento está dirigido a mi familia. A mi madre, por enseñarme que la educación y la cultura son cosas distintas pero igual de importantes, por la educación que me has dado, por darme todo lo que has podido, por tu espontaneidad y sentido del humor. A mi padre, por escucharme, e intentar darme siempre su mejor consejo, por intentar entender las cosas que hago en el laboratorio y por compartir aficiones disfrutando de la naturaleza y los animales (una pena que ya no criemos pájaros!!). A mi hermano Manolo, por tus consejos de hermano mayor y por iniciarme en el hobby de los acuarios marinos. Aunque sé que no te gusta, para mí siempre serás Manolín. A la "loca despeinada" de mi hermana Rebeca, por ser tan clara con sus palabras y ayudar tanto en casa. Espero que tengas mucha suerte con tu doctorado (no sabes lo que te espera guapa!!). A todos vosotros, porque aunque tengamos puntos de vista tan distintos, confiasteis en mí y sé que os sentís orgullosos, os quiero.

Finalmente, me gustaría dedicar esta tesis a mis bisabuelos Juan y Presenta, que aunque ya no están aquí, sé que se sentirían súper orgullosos de su "bebeco Raúl". A mi bisabuelo por ser tan bueno conmigo, por quererme tanto y darme tanto. A mi bisabuela, por sus consejos, por aquellas historias que me contabas de la guerra y la postguerra, por escucharme y ayudarme tanto... nunca olvidaré aquellos vasos de café concentrado que me preparabas y que me hacían estar despierto hasta las 5 de la mañana estudiando. Siempre me decías: "tu llegarás lejos, pero eso yo no lo veré..." ojalá allá donde estéis os llegue mi más profundo agradecimiento.

...gracias.

RESUMEN/ABSTRACT

La transformación tumoral es un proceso que tiene lugar mediante sucesivas oleadas de alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas alteraciones tienen consecuencias dramáticas en la fisiología de la célula conduciéndola desde un estado inicial normal hacia un estado final tumoral maligno. Durante la progresión tumoral la célula va avanzando a través de distintas fases mediante la adquisición de capacidades que conforman el fenotipo tumoral. Una de estas capacidades es la inmortalidad replicativa. Aunque se encuentra ampliamente aceptado que las células tumorales requieren de la adquisición de ésta capacidad, las células simplemente immortalizadas se rigen por la mayoría de las limitaciones fisiológicas impuestas por el organismo. Las células immortalizadas, entre otras características, presentan inhibición por contacto, no tienen capacidad de crecer con independencia de anclaje o de generar tumores en modelos de xenotransplante en ratones inmunodeficientes. Nosotros estamos interesados en la identificación y caracterización de genes que participen en transformación hematológica más allá de la adquisición de la inmortalidad replicativa. Para ello llevamos a cabo un análisis transcriptómico en el cual comparamos los perfiles de expresión de células B immortalizadas (LCL) con los perfiles de expresión de diferentes líneas celulares derivadas de linfoma de Burkitt (BL). Entre los más de 1.600 genes que se encuentran expresados diferencialmente, *CDCA7* se encuentra consistentemente sobre expresado en las células de BL. En este trabajo mostramos que *CDCA7*, una proteína de función desconocida, juega un papel fundamental en la transformación maligna de células de origen linfocitario y que la reducción de sus niveles de expresión mediante interferencia de ARN revierte a las células tumorales a un estado de características tumorigénicas similares a las LCL. Según el modelo de transformación tumoral progresiva, la adquisición de capacidades migratorias/invasivas se percibe como un evento tardío y con seguridad posterior a la adquisición de la inmortalidad replicativa. En este contexto hemos observado que *CDCA7* está implicado en procesos de invasión y migración celular. Considerando el papel observado de *CDCA7* en tumorigenesis y en migración/invasión durante el desarrollo de esta tesis, proponemos que *CDCA7* podría ser una diana terapéutica tremendamente interesante para ciertas neoplasias hematológicas.

Tumor transformation is a process that takes place by successive waves of genetic and epigenetic alterations. These changes have dramatic consequences on cell physiology, converting a normal cell into a malignant one. According to the tumor progression model, the cell moves forward through several stages by acquiring capabilities comprising the tumor phenotype. One of these stages is the acquisition of replicative immortality. Although it is widely accepted that tumor cells require the acquisition of this capability, the majority of the physiological limitations imposed by the organism governs cells that are only immortalized. Immortalized cells, among other features, show contact inhibition, do not grow independently of anchorage and do not generate tumors in xenograft models. We are interested in the identification and characterization of genes involved in hematologic transformation beyond the acquisition of replicative immortality. To this end, we performed a transcriptome analysis in which the expression profiles of immortalized B cells (LCL) were compared with those of different cell lines derived from Burkitt's lymphoma (BL). Among >1,600 genes differentially expressed between these cell types, *CDCA7* was consistently overexpressed in BL cells. In this work, we show that *CDCA7*, a protein of unknown function, plays a central role in the malignant transformation of lymphoid cells and that reduction of its protein levels by RNA interference reverts tumor cells to a state of tumorigenic properties similar to that of LCL. In the tumor progression model, the acquisition of migratory/invasive capabilities is perceived as a late event that likely occurs after the acquisition of replicative immortality. In this regard, we show that *CDCA7* is a central mediator of migration and invasion of lymphoma cells. Given the role of *CDCA7* in malignant transformation we propose this protein as a potential therapeutic target for the treatment of lymphoid malignancies.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS **ix**

RESUMEN/ABSTRACT **xv**

ÍNDICE **xix**

CLAVE DE ABREVIATURAS **3**

INTRODUCCIÓN **7**

1. TRANSFORMACIÓN TUMORAL: UN PROCESO DE VARIAS FASES. 9

1.1 Características generales de la transformación tumoral. 9

2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS. 11

2.1 Clasificación de las neoplasias hematológicas. 13

2.1.1 Clasificación de las neoplasias linfoides. 13

2.1.2 Clasificación de las neoplasias mieloides. 14

2.3 Tratamientos actuales de los desórdenes hematológicos y efectos secundarios. 17

2.4 Características moleculares de las neoplasias hematológicas. 19

2.5 Papel de C-MYC en el contexto hematológico. 20

3. LA PROTEÍNA CDCA7. 21

OBJETIVOS **23**

MATERIALES Y MÉTODOS **27**

1. LÍNEAS CELULARES. 29

2. MICROARRAY DE LÍNEAS CELULARES. 29

3. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL. 30

4. NORTHERN BLOT. 31

5. GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN DE CDCA7. 31

6. TRANSFECCIÓN CELULAR. _____	33
7. GENERACIÓN DEL SUERO POLICLONAL DE CONEJO. _____	33
8. INMUNOBLOT. _____	34
9. MUESTRAS DE PACIENTES. _____	35
10. INMUNOHISTOQUÍMICA. _____	36
11. GENERACIÓN DE LENTIVIRUS Y RETROVIRUS E INFECCIÓN DE CÉLULAS. _____	36
12. ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN Y CICLO CELULAR. _____	37
13. ENSAYOS FUNCIONALES DE TRANSFORMACIÓN <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> . _____	37
13.1 - Ensayo de formación de colonias en agar blando. _____	37
13.2 - Análisis de la formación de tumores en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (NOD-SCID). _____	38
13.2.1 – Animales. _____	38
13.2.2 – Células. _____	39
13.2.3 – Análisis inmunohistoquímico. _____	39
14. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR <i>IN VITRO</i> . _____	39
14.1 Análisis de la migración en “ <i>Transwells</i> ”. _____	39
14.1 Análisis de la motilidad celular “ <i>Video lapse assay</i> ”. _____	40
15. ENSAYOS DE INVASIÓN CELULAR <i>IN VIVO</i> . _____	41
16. INMUNOFLUORESCENCIA. _____	41
17. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS. _____	42
17.1 Immunoprecipitation. _____	42
17.2 Western blot. _____	43
17.3 Teñido con plata. _____	43
17.4 Preparación de las muestras y digestión de proteínas en gel. _____	44

17.5 Huella dactilar de la masa del péptido MALDI, análisis MS/MS y búsqueda en la base de datos. _____	45
18. ENSAYOS DE RESISTENCIA A LA APOPTOSIS. _____	46
18.1 Ensayo de privación de suero. _____	46
18.2 Ensayo de resistencia a tratamiento con drogas. _____	46
RESULTADOS _____	47
1. LA EXPRESIÓN DE CDCA7 SE ENCUENTRA ELEVADA Y PRESENTA UN PAPEL ONCOGÉNICO. _____	49
1.1. Las líneas celulares de linfoma de Burkitt muestran niveles de expresión de CDCA7 elevados en comparación con líneas simplemente inmortalizadas. _____	49
1.2. La expresión de CDCA7 se encuentra elevada en biopsias de pacientes de linfoma de Burkitt esporádico en comparación con tejidos control. _____	56
1.3. La expresión elevada de CDCA7 en células de linfoma de Burkitt es necesaria para el mantenimiento de su fenotipo tumoral. _____	57
1.4. La reducción de la expresión de CDCA7 en líneas celulares de linfoma de Burkitt no afecta a su proliferación ni altera su progresión entre las distintas fases del ciclo celular. _____	61
1.5. La expresión de CDCA7 se encuentra elevada en líneas celulares de tumores de origen hematológico. _____	62
1.6. La reducción de la expresión de CDCA7 en Linfoma Difuso y Leucemia T reduce su capacidad de formar tumores. _____	65
1.7. La expresión elevada de CDCA7 no es necesaria para el crecimiento independiente de anclaje de la neoplasia no linfoide HEK293-T. _____	66
1.8. El silenciamiento de la expresión de CDCA7 en fibroblastos primarios de piel humana S1F no altera su perfil de ciclo celular. _____	67
1.9. La reducción de los niveles de CDCA7 no afecta a la muerte celular en condiciones de privación de suero o en respuesta a tratamientos con drogas quimioterapéuticas. _____	69
2. LA EXPRESION ELEVADA DE CDCA7 OTORGA A LAS CÉLULAS TUMORALES PROPIEDADES MIGRATORIAS E INVASIVAS. _____	71

2.1. El silenciamiento de CDCA7 reduce significativamente la invasión <i>in vivo</i> en el modelo de pez cebra. _____	71
2.2. La expresión elevada de CDCA7 en la línea celular DG-75 es necesaria tanto para la motilidad celular como para la migración dirigida hacia un estímulo quimotáctico. _____	72
2.3. CDCA7 se comporta como un modulador del citoesqueleto de actina afectando al grado de nucleación de la actina y a la extensión celular. ____	75
2.4. La inmunoprecipitación de CDCA7 desvela presuntos interactores relacionados con el citoesqueleto de actina. _____	76
DISCUSIÓN _____	79
1. DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CDCA7 EN NEOPLASIAS LINFOCÍTICAS Y CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DEL FENOTIPO TUMORAL. _____	84
2. LA REDUCCIÓN DE CDCA7 PRODUCE UNA REDUCCIÓN DE LAS CAPACIDADES MIGRATORIAS E INVASIVAS. _____	90
CONCLUSIONES _____	95
BIBLIOGRAFÍA _____	99
PUBLICACIONES _____	113

CLAVE DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo
B-ALL: Leucemia Linfoblástica Aguda B
BCR: receptor de célula B
BL: linfoma de Burkitt
CDCA7: Cell Division Cycle Associated 7
CDK: quinasa dependiente de ciclina
DLBCL: linfoma difuso de células B grandes
eBL: linfoma de Burkitt endémico
EBV: Virus de Epstein-Barr
ECM: Matriz Extracelular
EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
FL: linfoma folicular
IMD: Muerte celular mediada por integrina
LCL: línea celular linfoblastoide B
MCL: linfoma de células del manto
pRB: proteína retinoblastoma
RTq-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
sBL: linfoma de Burkitt esporádico
SCID: inmunodeficiencia combinada severa
SEM: Error Estándar de la Media
shRNA: ARN interferente en horquilla
T-ALL: Leucemia Linfoblástica Aguda T
ML: Leucemia Mieloide
MZL: linfoma de la zona marginal
NHL: Linfoma no Hodgkin

INTRODUCCIÓN

1. TRANSFORMACIÓN TUMORAL: UN PROCESO DE VARIAS FASES.

La iniciación y la progresión tumoral son procesos de múltiples etapas que reflejan alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la transformación progresiva de las células normales en células derivadas altamente malignas (Hanahan y Weinberg, 2000) (Hanahan y Weinberg, 2011). Durante la progresión tumoral, las células cancerosas sufren mutaciones somáticas que causan anomalías en oncogenes y genes supresores. A pesar de que la mayoría de las mutaciones podrían resultar desfavorables, en determinadas ocasiones surgen algunas que dotan a la célula de capacidades ventajosas con respecto a las demás. Una de estas capacidades es la adquisición de la inmortalidad replicativa. Se encuentra ampliamente aceptado que las células cancerosas requieren de un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos (Hanahan y Weinberg, 2011). Es lo que se conoce comúnmente como inmortalización celular. Sin embargo, la simple adquisición de una célula del estado inmortalizado es insuficiente para explicar todas las características que presenta una célula tumoral.

1.1 Características generales de la transformación tumoral.

Biológicamente, los tumores evolucionan a través de la adquisición de capacidades que se producen como consecuencia de alteraciones genéticas afectando a importantes vías moleculares. Las vías más comúnmente afectadas incluyen rutas relacionadas con la replicación celular, la dinámica del citoesqueleto celular, la inducción de la angiogénesis, la reparación del ADN, la apoptosis, el metabolismo celular y la proliferación (Fig. 1). Las consecuencias de la alteración de estas vías permiten que las células evolucionen hacia el conocido fenotipo tumoral en el cual se incluyen cambios morfológicos y estructurales derivados de alteraciones en el citoesqueleto celular. Estos cambios suelen verse acompañados de una pérdida en la adhesividad celular como resultado de alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión intercelular (Cadherina E, por ejemplo). Esto favorece que las células tumorales malignas puedan desprenderse del tumor primario, pasar a la circulación y formar tumores secundarios en otros órganos, como ocurre durante la formación de metástasis.

Además, se multiplican en ausencia de los factores estimulantes del crecimiento, los cuales son requeridos por las células normales para su proliferación. De hecho, las células cancerosas sintetizan sus propios factores de crecimiento que actúan de forma autocrina y paracrina, estimulando a las células tumorales circundantes. Por lo tanto, se ha producido en ellas una alteración del ciclo celular, con modificación de los reguladores naturales de la mitosis. Por otro lado, las células cancerosas son angiogénicas, es decir, generan factores que inducen la formación de nuevos vasos a fin de suministrarle los recursos materiales y energéticos para su desarrollo y formar metástasis secundarias. Debido a todos estos cambios, las células cancerosas dejan de cumplir con las funciones específicas del órgano en cuestión ya que sufren un proceso de transformación originando un fenotipo diferente.

Estas capacidades adquiridas con respecto a las células normales son las que definen a las neoplasias, conformando el conjunto de características distintivas del cáncer. Al ser estas características exclusivas de las células tumorales, al mismo tiempo conforman un grupo de posibles dianas terapéuticas (Fig. 1).

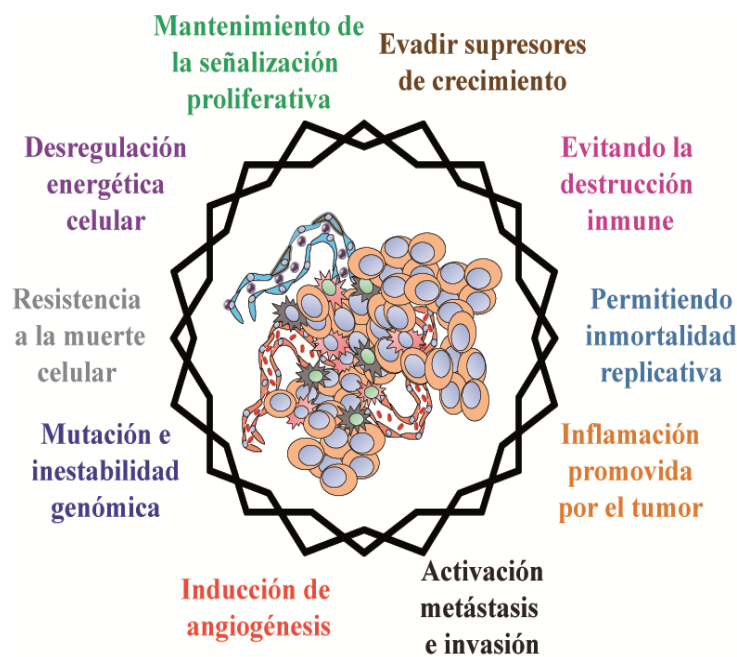


FIGURA 1. Esquema representativo de las características del cáncer. Durante el desarrollo del cáncer se produce la adquisición de una serie de capacidades necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral. El desarrollo de las distintas drogas terapéuticas tienen como diana alguna (si no más) de estas capacidades adquiridas durante el desarrollo de la enfermedad. Esquema adaptado de (Hanahan y Weinberg, 2011).

2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.

El sistema hematopoyético está integrado por células troncales, progenitoras e inmaduras de la médula ósea y el timo, así como por células funcionalmente maduras repartidas por todo el organismo. Muchas de estas células tienen funciones especializadas y su vida media es muy corta, por lo que deben ser repuestas continuamente. De este modo, se requiere de un control fisiológico preciso que regule su número y que depende directamente de la proliferación celular y de la diferenciación de las células troncales y progenitoras. Alteraciones de esta fina regulación pueden eventualmente originar síndromes tanto mielo como linfoproliferativos.

La incidencia anual de neoplasias hematológicas en Europa se acerca a 20 por cada 100.000 habitantes, convirtiendo a este tipo de tumores en la forma más común de cáncer en este continente y en el mundo. Las neoplasias de origen hematológico forman un grupo de entidades extremadamente heterogéneo. Este grupo de enfermedades se caracteriza por desencadenar procesos malignos que provienen de la expansión clonal de diversos tipos celulares implicados en el sistema hematopoyético. El evento de la transformación celular puede darse en cualquier estadio madurativo de la célula hematopoyética (Fig.2) determinando el estado de diferenciación, el fenotipo de la transformación (Vanasse *et al.*, 1999).

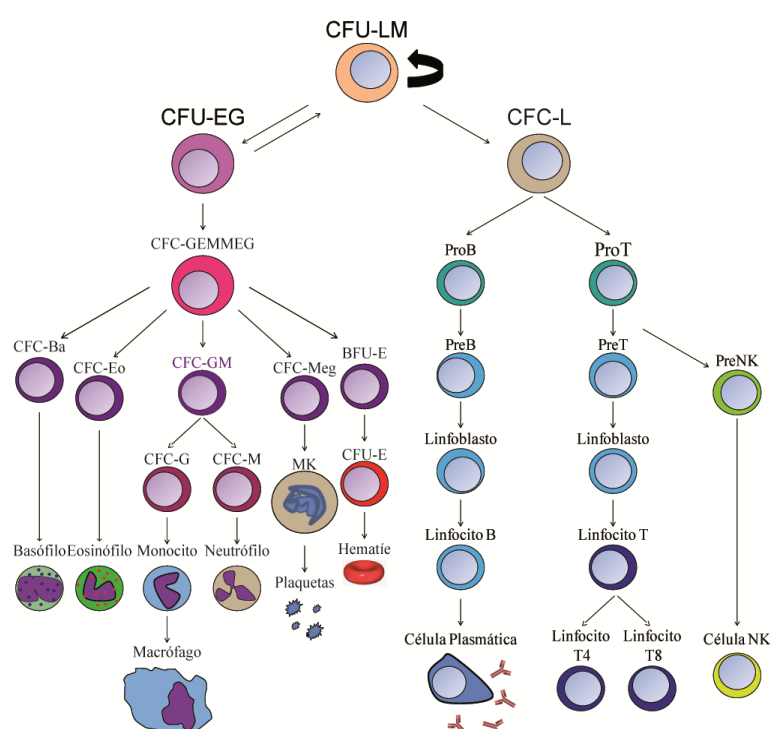


FIGURA 2. Esquema representativo de la hematopoyesis normal

Es decir, en el momento de la transformación neoplásica la célula queda "congelada" reteniendo los marcadores de membrana del estadio madurativo en el que se encontraba (Greaves, 1986; Kuppers *et al.*, 1999; Shaffer *et al.*, 2002). De acuerdo con varios estudios, encontramos que la incidencia varía con el tipo de malignidad hematológica (Morton *et al.*, 2007), (Morton *et al.*, 2006), (Rollison *et al.*, 2008). Las neoplasias linfoides son más comunes que las neoplasias mieloides. Además, para estos dos grupos de enfermedades, la incidencia presenta patrones característicos de incremento con la edad, afectando predominantemente a la población anciana (Sant *et al.*, 2010) (Fig. 3). La acumulación de daño en el ADN y la disminución de la vigilancia inmunológica asociada a la edad se han sugerido como causas de este incremento (Díaz-Regañón, 2006).

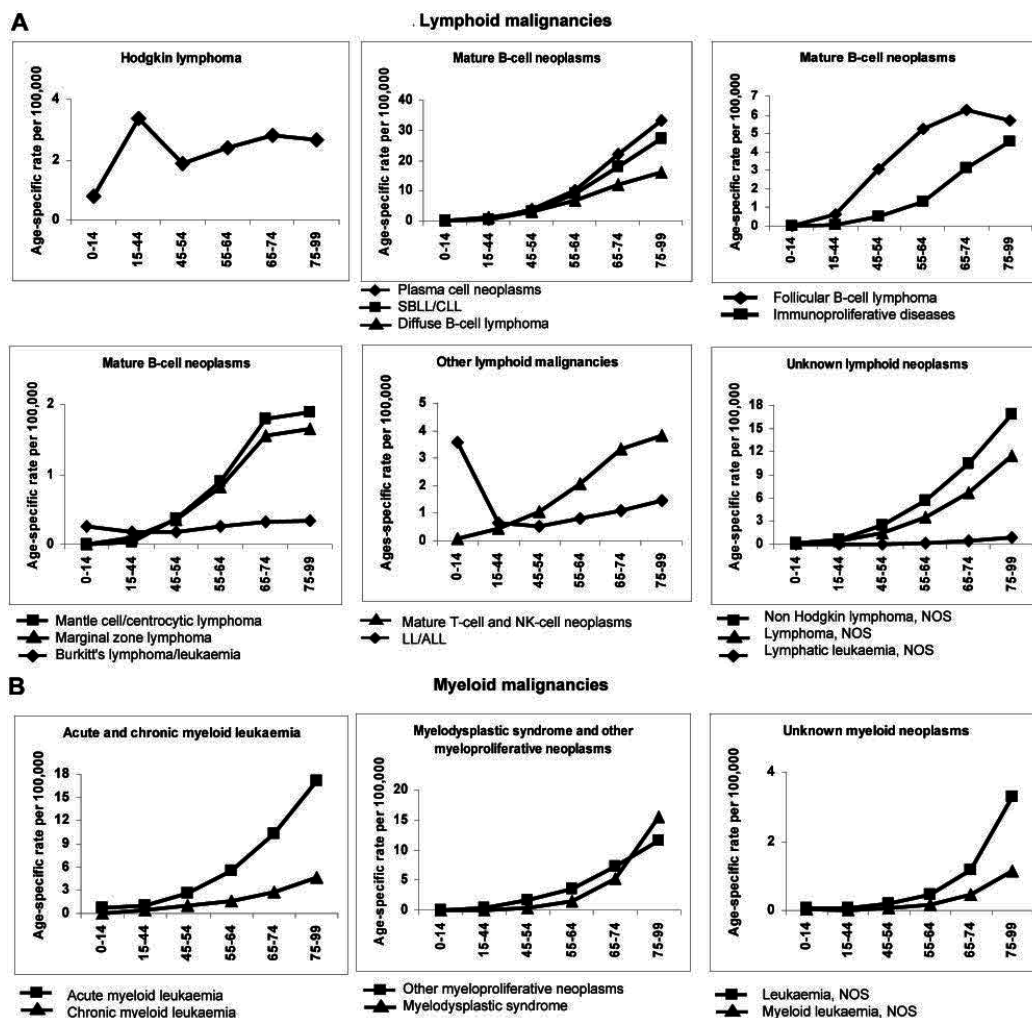


FIGURA 3. Tasas de incidencia específica por edad en neoplasias hematológicas (por 100000) diagnosticadas en 2000-2002. A) Malignidades linfoides. (B) Neoplasias mieloides. Reproducido de (Sant *et al.*, 2010).

2.1 Clasificación de las neoplasias hematológicas.

La propuesta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la clasificación de estas neoplasias malignas estratifica principalmente de acuerdo al linaje hematológico. De este modo, los tumores hematológicos se dividen en neoplasias mieloides, neoplasias linfoides, trastornos de mastocitos y neoplasias de histiocitos (Fig. 4). Dentro de cada categoría, las distintas enfermedades, se definen de acuerdo a una combinación de criterios morfológicos, inmunofenotípicos, características genéticas y síndromes clínicos.

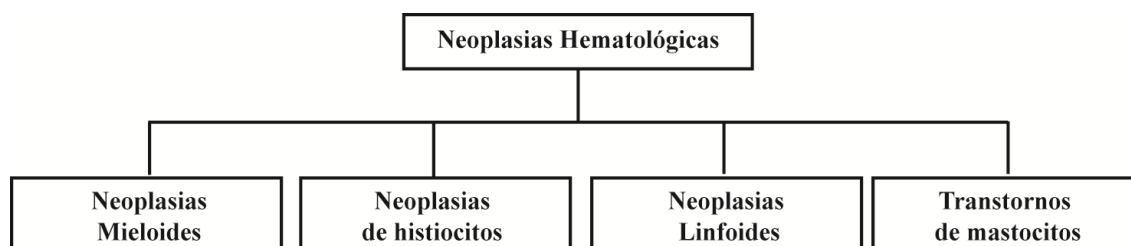


FIGURA 4. Esquema representativo de la clasificación de las neoplasias hematológicas según la OMS.

2.1.1 Clasificación de las neoplasias linfoides.

En 1997 la OMS adoptó una clasificación de las neoplasias linfoides publicada en 1994 (Clasificación R.E.A.L). En esta clasificación se definieron cuatro grupos de neoplasias linfoides: neoplasias de células B, neoplasias de células T y NK ("*Natural killers*"), linfoma de Hodgkin y enfermedad linfoproliferativa post-trasplante, con algunos subgrupos dentro de estas categorías (Harris *et al.*, 1999). A pesar de que para esta clasificación se usó una combinación de criterios morfológicos, inmunofenotípicos, citoquímicos, genéticos, citogenéticos y clínicos. Este modelo de clasificación ambiguo y con grupos muy heterogéneos, actualmente está siendo sometido a una intensa revisión (Jaffe *et al.*, 2008; Bakshi y Maghfoor, 2012) (Fig. 5).

El linfoma no Hodgkin (NHL) es la neoplasia maligna hematológica más común en adultos. Dentro de esta categoría, las neoplasias de células B constituyen el 85% de todos los NHL (Armitage y Weisenburger, 1998). La neoplásia de precursor de célula B más frecuente en la leucemia linfoblástica aguda (B-ALL). Dentro de las neoplasias de células B maduras, las más frecuentes son: la leucemia linfocítica crónica (B-CLL),

plasmacitoma, el linfoma extranodal de la zona marginal de tipo MALT (MZL), el linfoma folicular (FL), el linfoma del manto (MCL), el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y el linfoma de Burkitt (BL).

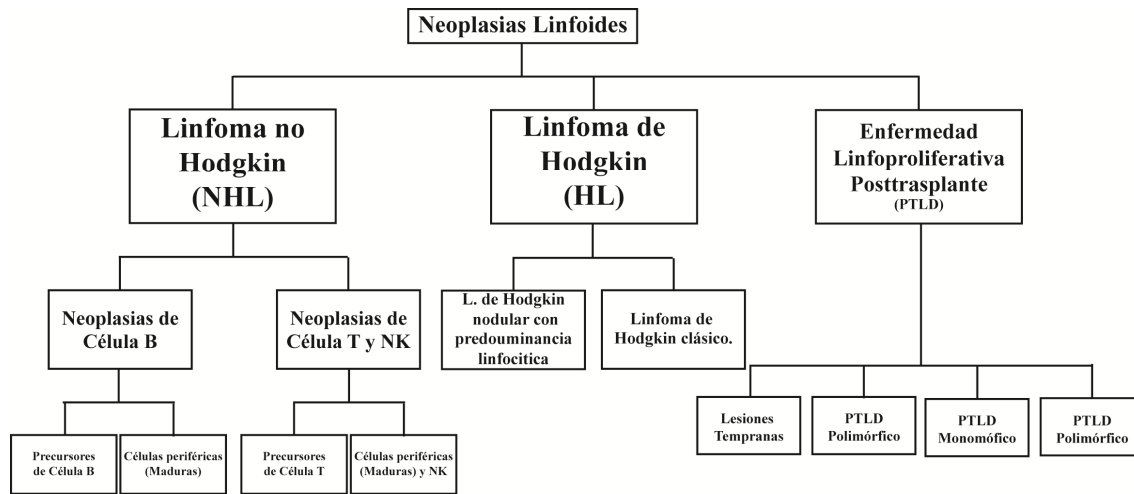


FIGURA 5. Esquema representativo de la clasificación de las neoplasias linfoides según la OMS.

2.1.2 Clasificación de las neoplasias mieloides.

La clasificación de los desórdenes mieloides genera numerosas controversias. Teniendo en cuenta que la clasificación REAL (*Revised European-American Lymphoma Classification*) adoptada por la OMS de los desórdenes linfoides incluye las características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas para definir las distintas entidades de enfermedades linfoides; podría, al menos tentativamente, aplicarse para los desórdenes mieloides. De este modo, los patólogos proponen cuatro grandes grupos de enfermedades mieloides: Enfermedad mieloproliferativa (MPD), enfermedad mielodisplásica/mieloproliferativa (MD/MPD), síndrome mielodisplásico (MDS) y leucemia mieloide aguda (AML). Dentro de la categoría de AML, se reconocen 4 grupos principales: 1) AML con translocaciones citogenéticas recurrentes. 2) AML con características relacionadas con la mielodisplasia. 3) AML y MDS asociado a terapia. 4) AML no clasificada en otras categorías (Fig. 6)(Harris *et al.*, 1999).

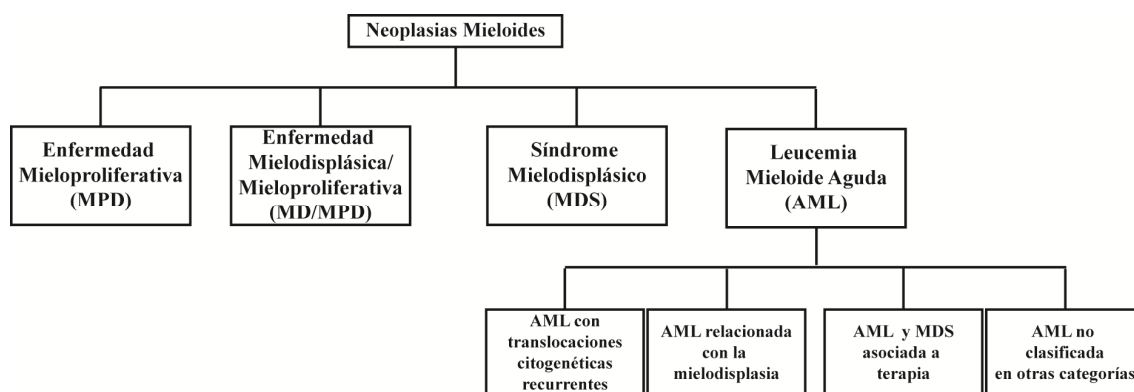


FIGURA 6. Esquema representativo de la clasificación de los desórdenes mieloproliferativos según la OMS.

2.2 Importancia de las líneas celulares para el estudio de las neoplasias hematológicas.

La obtención de líneas celulares hematológicas ha proporcionado una fuente abundante, accesible y manipulable de células vivas para el estudio de la fisiopatología de las células hematopoyéticas. Estas líneas celulares constituyen una herramienta indispensable para la investigación hematológica (Drexler y MacLeod, 2003a) y han contribuido de manera significativa a una mejor comprensión de la fisiopatología de los tumores hematopoyéticos (Drexler *et al.*, 1995; Drexler, 2000; Drexler *et al.*, 2000; Drexler y Matsuo, 2000b; 2000a; Drexler y MacLeod, 2003b; 2004; Drexler *et al.*, 2004; Drexler y Macleod, 2009). La primera línea derivada de linfoma de Burkitt (Raji) (Pulvertaft, 1965), se estableció en 1963. Desde entonces, se han descrito un gran número de líneas hematológicas. Las principales ventajas de líneas celulares son la disponibilidad material de células, suministro ilimitado en todo el mundo y la posibilidad de trabajar con un sistema relativamente homogéneo de células idénticas. Además existe la posibilidad de almacenamiento infinito viable en nitrógeno líquido. Las líneas tumorales de origen hematológico se caracterizan generalmente por su origen monoclonal, la detención de la diferenciación y una proliferación sostenida *in vitro* con la preservación de la mayoría de las características celulares y las alteraciones genéticas específicas del tumor de origen. Estas células, al igual que otras líneas tumorales de diferente origen tienen capacidad de crecer con independencia de anclaje en medios semisólidos y se caracterizan por ser tumorigénicas en modelos murinos de xenotransplante.

Las líneas celulares tumorales deben ser consideradas aparte de aquellas líneas celulares llamadas inmortalizadas. Estas células, a pesar de presentar una inmortalidad replicativa no son tumorigénicas, presentan un cariotipo diploide normal, y no pierden la funcionalidad del órgano de origen. Existen varios procedimientos para la inmortalización de células de origen hematológico. Uno de los métodos más populares es la inmortalización de linfocitos B mediante la infección con el virus de Epstein-Barr (EBV). La infección por EBV es considerada como una entidad linfoproliferativa benigna, autolimitada, donde los individuos convalecientes desarrollan una inmunidad dirigida no sólo contra el EBV, sino también contra las células transformadas por el virus. La infección por EBV "*per se*" no incrementa el potencial tumorigénico ni otorga a la célula la capacidad de crecer en medios semisólidos *in vitro* (Nilsson *et al.*, 1977). Sin embargo los cambios en el cariotipo y la acumulación de alteraciones en las LCL originales, debidas a un cultivo prolongado, pueden acabar permitiendo la adquisición de la capacidad de crecer en ensayos de agar blando y subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (Nilsson *et al.*, 1977).

Como ejemplo de la utilidad práctica de las líneas celulares hematológicas, se destacan los últimos avances en los estudios de citogenética clásica y molecular, que en gran parte fueron posibles gracias a las líneas celulares. Es evidente que con la apertura de nuevas vías de investigación, los estudios de líneas celulares han arrojado luz sobre la biología de las neoplasias hematopoyéticas. Durante un período de casi cuatro décadas, estos cultivos de células inicialmente exóticas y que sólo conocían unos pocos especialistas, se han convertido en poderosas herramientas de investigación que están disponibles para todos los investigadores.

Además de las ventajas anteriormente citadas, también existen una serie de inconvenientes relacionados con el uso de líneas celulares hematológicas. Por ejemplo, la eficiencia de establecimiento de líneas celulares es bastante baja y el establecimiento deliberado de nuevas líneas de células hematológicas sigue siendo, por lo general, un proceso aleatorio impredecible. Un gran porcentaje de líneas celulares hematológicas están contaminadas con micoplasma (aproximadamente 30%) o son el resultado de contaminación cruzada con otras líneas celulares (aproximadamente 15-20%). Además, el mantenimiento de estas líneas celulares durante largo períodos de tiempo permite la acumulación de alteraciones genéticas adicionales a las que estaban presentes en el

tumor de origen. Las soluciones a estos problemas son la detección sensible, la eliminación efectiva y rigurosa prevención de la infección por micoplasma además de la autenticación adecuada y regular de las líneas celulares. La causa subyacente de estos problemas, parece ser una práctica negligente de las normas de cultivo.

En resumen, la disponibilidad de un gran número de líneas celulares de origen hematológico ha facilitado en gran medida los estudios clínicos e inmunobiológicos de la hematopoyesis normal y maligna. Las líneas celulares hematológicas continuarán constituyendo modelos tremendamente útiles para muchas disciplinas biomédicas.

2.3 Tratamientos actuales de los desórdenes hematológicos y efectos secundarios.

Tras las últimas clasificaciones llevadas a cabo por la OMS, parece claro que el conocimiento de la morfología, inmunofenotipo y genotipo, así como de los mecanismos moleculares que dan lugar a la transformación maligna de las células hematopoyéticas, son factores determinantes en la selección de los tratamientos. Los tratamientos actuales de las neoplasias de origen hematológico varían mucho dependiendo de la naturaleza y el estadiaje de la enfermedad. Los tratamientos pueden variar desde una simple “espera en observación”, como en el caso de la leucemia linfocítica crónica (LLC), hasta regímenes de poliquimioterapia agresiva con profilaxis intratecal para los casos de linfoma de Burkitt (LB).

El objetivo último de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa mediante una batería de métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos. En este último apartado, los distintos fármacos pueden clasificarse en función de su mecanismo de acción o del momento de actuación en el ciclo celular, pudiéndose distinguir fármacos antimetabolitos, fármacos que interfieren en la dinámica de polimerización de microtúbulos, inhibidores de las topoisomerasas, agentes alquilantes, cis-platino, antibióticos, L-asparaginasa, hormonas y moduladores de la respuesta inmune. Los actuales tratamientos de las neoplasias hematológicas hacen referencia a regímenes combinados de quimioterapéuticos administrados en diferentes ciclos. Existen protocolos estándar para las diferentes formas de cáncer y su estadiaje, así como variaciones de los mismos dependiendo de las características del enfermo y de su reacción a determinados componentes de los regímenes.

Los protocolos de quimioterapia promueven la detención de la división celular y la destrucción preferencial de las células cancerosas frente a la de las sanas. Este efecto farmacológico se basa en alteraciones características de las células malignas en su maquinaria de reparación del ADN y de control del ciclo celular. A pesar de la eficacia demostrada de los actuales protocolos, los tratamientos quimioterapéuticos actuales presentan el inconveniente de provocar una serie de efectos secundarios sobre el resto del organismo, debidos, principalmente, al efecto tóxico de los fármacos sobre las células sanas.

Las células más afectadas por el efecto citotóxico de la quimioterapia son aquellas que comparten características con las células tumorales, especialmente la multiplicación celular a gran velocidad, como son las de los folículos pilosos, médula ósea, el tubo digestivo y el sistema reproductor. Esto hace que los efectos secundarios más frecuentes que se pueden observar en el tratamiento de las neoplasias hematológicas sean pérdida del cabello, infertilidad, mucositis severa, infecciones, toxicidad hematológica (leucopenia, trombocitopenia y eritropenia), náuseas y vómitos. Efectos secundarios adicionales de las terapias anti-tumorales actuales incluyen neurotoxicidad, toxicidad pulmonaria y enfermedad cardíaca. Además de estos efectos secundarios a corto plazo, existe riesgo de desarrollar cáncer (leucemia) años después del tratamiento.

La gravedad de algunos de estos efectos secundarios justifica que se continúe trabajando en la identificación y caracterización de nuevas dianas terapéuticas en las que basar el desarrollo de terapias anti-tumorales menos tóxicas que los actuales tratamientos. El descubrimiento de nuevos genes que participan en estadios específicos de la progresión tumoral permitirá conocer mejor la biología del tumor y hará posible el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y de nuevos análisis moleculares para el correcto diagnóstico y monitorización de los pacientes. En el caso de las neoplasias hematológicas se está trabajando con posibles estrategias de terapia génica. En principio, dado que estas enfermedades tienen su origen en desórdenes genéticos, este tipo de terapias constituiría una aproximación muy adecuada para su tratamiento ya que de forma directa conduciría a la corrección de anomalías presentes en las células malignas con unos efectos adversos mínimos. Sin embargo, la ineficiencia de los actuales sistemas de vehiculización, su incapacidad de llegar específica y exclusivamente a las células malignas y la propia naturaleza diseminada de la mayor

parte de estas neoplasias hacen que la "corrección génica" no sea viable por el momento (Vizmanos *et al.*, 2000).

2.4 Características moleculares de las neoplasias hematológicas.

Se han descrito un gran número de alteraciones moleculares en los distintos tipos de neoplasias hematológicas afectando a una gran variedad de proteínas. Estas alteraciones convergen en vías de señalización comunes que promueven la proliferación, bloquean la diferenciación, inhiben la muerte celular o inducen la inestabilidad genómica. Un tipo de alteración citogenética frecuente en neoplasias hematológicas es la delección cromosómica. Este evento genético puede constituir un mecanismo molecular de inactivación de genes supresores tumorales. Por ejemplo, deleciones del brazo corto del cromosoma 17 provocan pérdida de un alelo del gen *TP53*, y si el otro alelo está mutado el gen se inactiva (Imamura *et al.*, 1994).

Uno de los eventos más comunes en este grupo de neoplasias son las translocaciones cromosómicas, convirtiéndose en muchas ocasiones en marcadores con valor diagnóstico de la enfermedad. Hasta el momento se han identificado en torno a 1.800 puntos de rotura en las alteraciones cromosómicas asociadas a neoplasias. La caracterización molecular de gran parte de ellos ha facilitado la identificación de nuevos genes supresores de tumores y oncogenes de tumores (Mitelman *et al.*, 1997; Kirsch y Ried, 2000). Todas las alteraciones cromosómicas descritas en cáncer pueden ser consultadas en la base de datos del Proyecto de Alteraciones Cromosómicas en Cáncer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP>). Algunos ejemplos de translocaciones en los linfomas son t(8;14), t(14;18) y t(11;14), asociadas a linfomas de Burkitt, folicular y del manto, respectivamente. Estas translocaciones han permitido localizar y aislar los oncogenes implicados en estas patologías: c-MYC (Dalla-Favera *et al.*, 1982), (Taub *et al.*, 1982), BCL1 (Motokura *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 1991), y BCL2 (Tsujimoto *et al.*, 1985). Para estos casos, el mecanismo molecular subyacente consiste en la activación de estos protooncogenes por yuxtaposición con secuencias reguladoras del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) localizado en el cromosoma 14, originado una sobreexpresión del protooncogén en cuestión (Willis y Dyer, 2000).

Otro mecanismo molecular fue descrito al estudiar la translocación t(9;22) asociada a leucemia mieloide crónica (LMC). En este caso, la activación oncogénica se produce por la translocación que afecta a los loci de los genes C-ABL y BCR, formando un gen de fusión BCR-ABL con capacidad oncogénica (Rowley, 1990). Este oncogén codifica para una proteína quimérica con potencial neoplásico actuando en un mecanismo muy frecuente en numerosas translocaciones descritas en leucemias y sarcomas (Rabbitts, 1994) y (Rabbitts, 1998). Además de las translocaciones cromosómicas, la activación de algunos protooncogenes es el resultado de amplificación génica, como en el caso de los genes REL y c-MYC (Rao *et al.*, 1998).

En resumen, el gran avance que se ha experimentado en el conocimiento de las alteraciones cromosómicas recurrentes en cáncer durante las últimas dos décadas, ha permitido no sólo conocer la importancia clínica de dichas alteraciones, sino también, caracterizar el mecanismo molecular de muchas de ellas, identificando y clonando los genes implicados (Mitelman, 2000).

2.5 Papel de C-MYC en el contexto hematológico.

C-MYC es uno de los grandes paradigmas de proteínas pleiotrópicas que regulan multitud de procesos de la biología celular. C-MYC es un miembro de una familia de protooncogenes entre los que se encuentran N-MYC, L-MYC, S-MYC y B-MYC. Este factor de transcripción regula la expresión de multitud de genes diana mediando en procesos tan importantes como la replicación, el metabolismo, crecimiento celular, la diferenciación o la apoptosis (Adhikary y Eilers, 2005), (Baena *et al.*, 2005), (Dang, 1999), (de Alboran *et al.*, 2001; de Alboran *et al.*, 2004; Zanet *et al.*, 2005). En la mayoría de los genes diana, C-MYC ejerce su función a nivel del promotor mediante la unión a secuencias consenso conservadas denominadas cajas-E, algunos ejemplos son *B23 (NPM1)*, *CAD*, *CDK4*, *CCND2*, *ID2*, *LDH-A*, *MNT*, *PTMA*, *ODC*, *NM23B*, *NCL*, *PHB*, *SHMT1* y *SHMT2* aunque también se ha demostrado que puede hacerlo mediante su unión a elementos que carecen de éstas secuencias, como es el caso de *CDCA7*, *CCNB1* y *PRDX3* (Haggerty *et al.*, 2003). Además, C-MYC también puede ejercer su papel regulador mediante el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas.

Aunque el potencial oncogénico de la desregulación de *MYC* en las células hematopoyéticas fue ampliamente demostrado a mediados de los años 1980, la sobreexpresión únicamente del protooncogen *MYC* no conduce a transformación. Son necesarias alteraciones adicionales para el desarrollo del tumor (Lombardi *et al.*, 1987). Una prueba de ello es que la expresión elevada de C-MYC por sí sola en células normales conduce a una acumulación de células en la fase G2 del ciclo celular o a la muerte celular, dependiendo de la presencia (Felsher *et al.*, 2000) o ausencia de factores de crecimiento (Packham y Cleveland, 1995), respectivamente. Cabe destacar que la sobre-activación de PI3K y su mediador AKT tiene un efecto protector frente la apoptosis inducida por MYC (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997). Por otro lado, ratones transgénicos que expresan C-MYC bajo el potenciador E μ del gen de las inmunoglobulinas (ratones E μ -myc), desarrollan linfomas pre-B y de células B después de un período de latencia de 4-6 meses (Adams *et al.*, 1985). El período de latencia observado antes de la aparición del linfoma en estos ratones y la clonalidad de las células del linfoma dirigidas por MYC, apuntan claramente a que la expresión desregulada de C-MYC "*per se*" no es suficiente para desencadenar la enfermedad. Esto indica que hacen falta lesiones genéticas adicionales que puedan cooperar con MYC para inactivar supresores de tumores y para evadir las vías de apoptosis inducidas por MYC (Langdon *et al.*, 1986), (Klapproth y Wirth, 2010). Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de los genes con regulación aberrante consecuente a la expresión alterada de C-MYC, aún se desconoce cuáles de éstos genes están implicados en la transformación inducida por esta proteína.

3. LA PROTEÍNA CDCA7.

CDCA7, también llamado JPO1, es una proteína de función desconocida que se describió en 2001 y cuya expresión es inducida por C-MYC (Prescott *et al.*, 2001). Este gen se encuentra en el cromosoma 2 (2q31.1) y codifica para dos isoformas que son generadas por ajuste alternativo. CDCA7 se expresa en altos niveles en colon, timo, e intestino delgado y a bajos niveles en testículos, estómago y médula ósea (Prescott *et al.*, 2001). A nivel de ARNm, se ha encontrado que *CDCA7* se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de tumores en relación a los niveles mostrados en los tejidos de referencia (Osthus *et al.*, 2005). Sin embargo, estos estudios no se han llegado a validar a nivel de proteína y de momento se desconoce si hay un incremento de la

proteína CDCA7 en estos casos. Además, el incremento de los niveles del ARNm de *CDCA7* en comparación con los tejidos circundantes no tumorales podría ser consecuencia de una baja tasa proliferativa de los tejidos usados como control. Esto es especialmente importante si tenemos en cuenta que *CDCA7* se induce en fase S (Whitfield *et al.*, 2002). La inducción de *CDCA7* por C-MYC es directa, al menos en parte (Prescott *et al.*, 2001) y podría estar mediada por secuencias reguladoras muy poco conservadas (Haggerty *et al.*, 2003). Pero también podría ser parcialmente indirecta y estar mediada por E2F (Goto *et al.*, 2006). Aunque se ha sugerido que *CDCA7* participa en transformación neoplásica, su sobre-expresión en la línea celular de fibroblastos Rat1a apenas induce su crecimiento independiente de anclaje (Prescott *et al.*, 2001) y su expresión forzada en modelos murinos también sugiere que su actividad transformante es más bien limitada (Osthus *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

Durante el desarrollo de esta tesis nos propusimos identificar y caracterizar funcionalmente genes que pudieran contribuir a la transformación tumoral maligna de las células hematopoyéticas en un estadio posterior a la consecución de la inmortalidad replicativa. Para ello nos servimos de un modelo de líneas celulares que pensamos que podría ser una herramienta útil para estos estudios: la comparación de líneas de linfocitos B normales inmortalizados mediante infección con EBV con líneas de linfocitos B tumorales obtenidas de diversos linfomas y leucemias. Usando este sistema de líneas celulares nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Identificar genes con potencial oncogénico mediante comparación del transcriptoma de células inmortales y células tumorales hematopoyéticas**
- 2.- Estudiar la participación de genes identificados y seleccionados por su potencial regulador de la transformación tumoral.**
- 3.- Profundizar en mecanismos celulares y moleculares de los procesos patobiológicos en los que están implicados estos genes.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES.

Las líneas celulares de BL (DG-75, Mutu-1, Akata, Ramos y BL2), DLBCL (DB, OCI-LY-19, Karpas-422, Toledo), linfoma folicular (Wsu-NHL y RS11846), linfoma de células del manto (Z138 y Granta 519), leucemia linfoblástica aguda T (Jurkat y Molt-4), linfoma no-Hodgkin (SUDHL.4 y RL), así como las líneas linfoblastoides B (X50-7, JY, JC5, IB4, Alewife y Boston) y las líneas celulares RPMI8226 (mieloma de célula B), Hel (eritroleucemia), U937 (leucemia mieloide) y K562 (eritroleucemia) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco). Las líneas celulares HEK-293T (células embrionarias de riñón humano), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), SAOS2 (osteosarcoma), U2OS (osteosarcoma), HCT-116 (carcinoma colorectal) y las células primarias S1F (fibroblastos diploides de piel humana) se cultivaron en medio DMEM (Life Technologies, Gibco). Ambos medios se suplementaron con 2mM de glutamina, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (Life Technologies, Gibco) inactivado a 56°C durante 30 minutos. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador humificado en presencia de 5% de CO₂.

2. MICROARRAY DE LÍNEAS CELULARES.

El ARN total de las líneas celulares linfoblastoides X50-7, IB-4 y Dana se extrajo con el kit RNeasy siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Qiagen). El ARN de las 3 líneas celulares fue mezclado en cantidades equimolares y marcado con Cy3 para su uso como control. Las 3 líneas de BL esporádico DG-75, BL2 y Ramos y las 2 líneas de BL endémico Mutu-1 y Akata, fueron marcados con Cy5. Todas las muestras fueron marcadas usando el Kit comercial "*Ambion Aminoallyl Labeling Kit*", utilizando 1 µg de ARN total.

Tras la fragmentación del ARN, cada una de las 5 muestras de BL fue mezclada en cantidades equimolares con el pool control y se hibridó durante la noche a 42°C con la membrana Capital Bio. Tras el lavado estándar, los arrays fueron escaneados usando el escáner Capital Bio Luxcan 10K. A partir de las lecturas realizadas, los datos fueron

extraídos usando el software del propio escáner (Luxscan3 software). En total se procesaron 5 arrays.

El análisis estadístico fue llevado a cabo por la unidad de bioinformática del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). El análisis se ha llevado a cabo en el marco estadístico R [<http://www.r-project.org/>] con los paquetes "marray" [<http://www.bioconductor.org/packages/2.10/bioc/html/marray.html>] y "limma" [<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>] para ambas etapas de este análisis se realizó un pre-procesamiento y control de calidad de los datos y la detección de genes expresados diferencialmente. El preprocesamiento se llevó a cabo mediante: (1) Corrección del ruido de fondo. Método: Sustracción. (2) Normalización dentro del array. Método: normalización print-tip. (3) Normalización entre arrays. Método: transformación de escala MAD. Para el análisis estadístico se utilizaron modelos lineales aplicados por el paquete "limma" para encontrar los genes expresados diferencialmente entre las condiciones. Se realizó una clasificación funcional del listado de genes obtenido utilizando para ello el programa on-line PANTHER (**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships) (<http://www.pantherdb.org/>). Los detalles del método de clasificación usado por PANTHER pueden ser encontrados (Thomas et al., Genome Research 2003; Mi et al. NAR 2005).

3. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

El ARN total se extrajo de los cultivos celulares o de los tejidos congelados con el kit RNeasy siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Qiagen). El ADNc se obtuvo utilizando el Kit High-capacity ADNc Reverse transcription. Se llevó a cabo la retrotranscripción con MultiScribeTM Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) a partir de 250 ng de ARN total en un volumen total de 10 µl. Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se llevaron a cabo en el servicio de genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBm) empleando Kits TaqMan (Applied Biosystems) de *ID3* (Hs00171409_m1), *CDCA7* (Hs00230589_m1) y β -*ACTINA*. Para las medidas específicas de cada isoforma de *CDCA7* se usaron Kits TaqMan (Hs00914361_g1 para *CDCA7-2* y Hs00912235_g1 para *CDCA7-1*). La PCR se realizó empleando el Sistema AB 7900 HT Fast Real PCR (Applied Biosystems) según las

instrucciones de la casa distribuidora. β -*ACTINA* se empleó como gen control debido a su expresión homogénea entre las muestras de tejidos, así como entre las líneas celulares. Para el screening de shRNAs se utilizó *TBP* como estándar endógeno y el *S18* fue usado como estándar endógeno para determinar la eficiencia del silenciamiento en la línea DG-75. En cada experimento se analizaron triplicados de cada una de las muestras. Los resultados se normalizaron y analizaron mediante el programa S.D.S 2.2. (Applied Biosystems).

4. NORTHERN BLOT.

La extracción de ARN total de cultivos con menos de 10×10^6 células se realizó con el kit RNeasy siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Qiagen). Se emplearon 10 μ g de ARN total de cada muestra para el Northern Blot. Las muestras se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa con 2% de formaldehído y se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham). Los procesos de fijación, tinción, hibridación y lavado de la membrana se realizaron según estaba descrito (Molina-Privado *et al.*, 2009). Como sondas se emplearon fragmentos de ADNc correspondientes a la isoforma de *CDCA7-2* y a γ -*ACTINA* que fueron marcados con 32 P en el extremo 5' con el kit Random Prime Labelling System (AmershamTM, GE Healthcare).

5. GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN DE CDCA7.

Para clonar las 2 isoformas de *CDCA7* (*CDCA7-1* y *CDCA7-2*) en el vector de expresión pCDNA3 (Life Technologies, Invitrogen) se llevaron a cabo 2 estrategias diferentes (Fig. 7). La primera estrategia se realizó para el clonaje de la isoforma corta *CDCA7-2*. A partir del RNA total de la línea celular de Burkitt Akata se realizó una retrotranscripción con random primers, seguida de una PCR específica con primers que hibridan al principio y al final de la secuencia de *CDCA7*. La secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación fue la siguiente:

Oligo directo: 5' - ctaagcatcgatatggacgctcgccgcgtgc - 3'

Oligo reverso: 5' - tgcattgctagatttatgcttgcatcattcaaatcctgtttcaggc - 3'

Estos oligonucleótidos fueron diseñados con los sitios de restricción ClaI y NotI respectivamente (subrayados). En negrita se indican los codones de inicio y fin de la traducción. Según el diseño de estos dos oligos, deberíamos obtener tanto la isoforma corta como la larga. Sin embargo, sólo se consiguió amplificar *CDCA7-2*. El amplicón resultante que contiene 1140pb se ligó directamente mediante clonaje T-A al vector pGEMT-Easy (pGEMT-CDCA7-2) con el kit pGEM®-T Easy (Promega). Finalmente mediante doble digestión enzimática (ClaI/NotI), se subclonó la secuencia directamente a una versión modificada del vector pCDNA3 que contiene la etiqueta HA (pCDNA3-HA) para generar pCDNA3-HA-CDCA7-2.

Para el clonaje de la isoforma larga (*CDCA7-1*), se realizó una retrotranscripción a partir de RNA total seguida de una PCR específica empleando el mismo oligo directo que en el clonaje anterior y un oligo interno para CDCA7 que permitía amplificar un fragmento más pequeño (682pb) y que contiene el exón adicional (exon 3) presente en la isoforma larga y ausente en la corta. El producto de PCR se ligó en pGEMT-Easy (Promega), y se insertó en CDCA7-2 (pGEMT-CDCA7-2) utilizando los sitios BglII y HindIII que flaquean al exón 3 de CDCA7-1 (pGEMT-CDCA7-1). Se recurrió a la construcción de la isoforma corta en pGEMT-Easy y no directamente la del pCDNA3 dado que en este último había más sitios BglII y HindIII que impedían la correcta ligación del inserto. Una vez insertado en pGEMT-Easy se subclonó la secuencia completa en pCDNA3-HA mediante doble restricción (ClaI y NotI) para obtener pCDNA3HA-CDCA7-1.

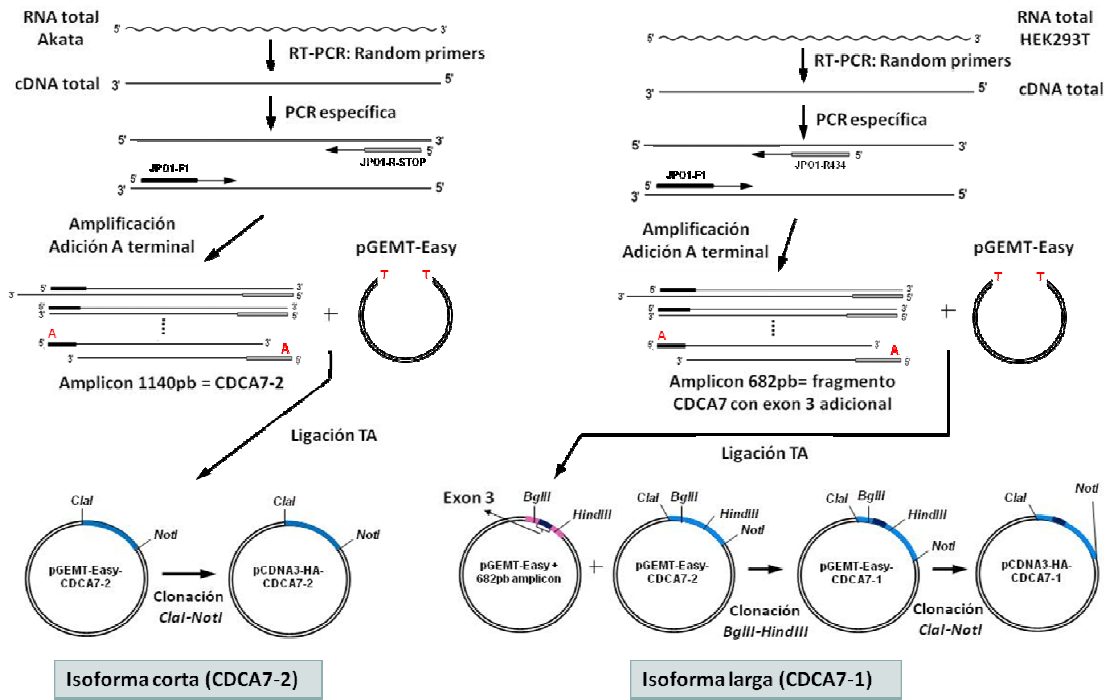


Figura 7. Esquema de la estrategia seguida para la generación de los vectores de expresión de CDCA7-1 y CDCA7-2. A) Representación esquemática del procedimiento seguido para clonar CDCA7-2 y B) CDCA7-1 en pCDNA3.

6. TRANSFECCIÓN CELULAR.

Las células HEK-293T fueron transfectadas al 70-80% de confluencia mediante el método del fosfato cálcico (Campanero y Flemington, 1997) con 30µg de los vectores: pCDNA3-HA, pCDNA3-HA-CDCA7-1 o pCDNA3-HA-CDCA7-2. 16 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS1X suplementado con 5 mM de EDTA y posteriormente con PBS1X. Las células se mantuvieron durante 24h más en condiciones normales de cultivo y se procedió a la obtención de extractos de proteínas que fueron analizados mediante inmunoblot.

7. GENERACIÓN DEL SUERO POLICLONAL DE CONEJO.

La síntesis de 20 mg de un péptido ((N - CRGRHPLPGSDSQSRRPR – C) presente en ambas isoformas de CDCA7 fue encargada a Immunostep. Se disolvieron 2 mg de péptido no purificado en 100 µl de agua A.C.S. (Sigma-Aldrich) y 2 mg de KLH (77605, Thermo Scientific) en 2 ml de agua A.C.S. Se conjugó el péptido con KLH

mezclando 600 µl de KLH gota a gota sobre 60 µl de péptido y se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

A día 0 y antes de la vacunación de los conejos se obtuvo un sangrado con el objetivo de tener un suero pre-inmune para usar como control en los diferentes ensayos. Para la primera inoculación se mezclaron 200 µl de KLH-péptido con 600 µl de PBS 1x y 800 µl de adyuvante completo (Complete Freund's Adjuvant, Thermo Scientific). Se emulsionó la mezcla varias veces hasta conseguir las condiciones óptimas para su inoculación intradérmica.

Para los recuerdos se mezclaron 100 µl de KLH-péptido con 600 µl de PBS 1x y 700 µl de adyuvante incompleto (Incomplete Freund's Adjuvant, Thermo Scientific). Se emulsionó la mezcla hasta conseguir las condiciones óptimas para su inoculación. Antes de cada recuerdo se realizaron sangrados (5-10 ml) para monitorizar el aumento de la especificidad de suero con los diferentes recuerdos. Los recuerdos fueron intramusculares o intradérmicos siguiendo el siguiente esquema:

Día 0	→ Presangrado e inmunización (I. Intradérmica).
Semana 2	→ Primer Recuerdo (I. Intramuscular)
Semana 6	→ Segundo Recuerdo (I. Intramuscular)
Semana 8	→ Primer sangrado
Semana 11	→ Tercer Recuerdo (I. Intramuscular)
Semana 13	→ Segundo sangrado
Semana 15	→ Cuarto Recuerdo (I. Intradérmica)
Semana 17	→ Tercer sangrado
Semana 19	→ Quinto Recuerdo (I. Intramuscular)
Semana 21	→ Sangrado Final.

8. INMUNOBLOT.

Todos los extractos fueron preparados a partir de células subconfluentes o en crecimiento exponencial. Se prepararon extractos totales de distintas líneas celulares mediante hervido de las muestras durante 10-15 minutos en un tampón de lisis desnaturalizante (0,125 M de Tris-HCl (pH=6,8), 4% de SDS y 20% de glicerol). La

concentración de proteínas se cuantificó mediante el método Lowry con el kit DcProtein Assay (BioRad laboratories). Tras la cuantificación se añadió a las muestras β -mercaptoethanol (1:100 v/v) y azul de bromofenol. Se emplearon 50 μ g de proteína total por muestra. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (40%poliacrilamida/bisacrilamida 29:1, BioRad) con fase separadora del 8% y se transfirieron en húmedo a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.45 μ m. El inmunoblot se realizó según estaba descrito previamente (Alvaro-Blanco *et al.*, 2009). La equivalencia de la carga de proteína fue verificada mediante tinción con rojo Ponceau (Sigma-Aldrich). La membrana se bloqueó con TBS1X suplementado con 2% de suero fetal bovino y 5% de leche en polvo desnatada. Se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-ID3 (1:1000; H00003399-M03 de Abnova); anti-CDCA7 (1:1000; HPA005565 de Sigma-Aldrich); Suero policlonal de conejo anti-CDCA7 S99 (1:5000); y anti-Tubulina (1:12000; T9026 de Sigma Aldrich), diluidos en solución de bloqueo suplementado con 0,2% de Tween-20. A continuación se utilizaron los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-ratón o anti-conejo (1:14.000; A2304 y A1949, respectivamente, de Sigma Aldrich) diluidos en solución de bloqueo o anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados con IR 800 Dye e IR 680 Dye (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Los anticuerpos conjugados con IR Dye fueron diluidos 1:14.000 en solución de bloqueo suplementado con 0,02% SDS + 0,2% de Tween-20. Para la detección de quimioluminiscencia se empleó el reactivo Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer). La emisión en 700 y 800 nm de los anticuerpos secundarios con IR Dye fue detectada empleando un escáner Odyssey Infrared Imager (Nº de modelo: 9120, LI-COR Biosciences).

9. MUESTRAS DE PACIENTES.

Todos los casos se obtuvieron de la Red Española del Banco de Tumores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Se obtuvo la aprobación de la Junta de Revisión Institucional para estos estudios y todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Las muestras de biopsias de diferentes casos de linfoma fueron revisados por MA Piris y su equipo de expertos hematopatólogos utilizando los criterios de la Organización Mundial de la Salud (Jaffe *et al.*, 2008). Finalmente, se seleccionaron veinte casos correspondientes a pacientes de linfoma de Burkitt

esporádico que no estaban inmunocomprometidos, junto con tres muestras de amígdalas reactivas.

10. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las muestras de tejidos de pacientes embebidas en parafina se marcaron con los anticuerpos anti-CDCA7 (S99) y contratiñeron posteriormente con hematoxilina. Estas tinciones se realizaron según estaba descrito (Conde *et al.*, 2007). Las muestras se analizaron por microscopía.

11. GENERACIÓN DE LENTIVIRUS Y RETROVIRUS E INFECCIÓN DE CÉLULAS.

Las células HEK-293T, utilizadas como células empaquetadoras, fueron cotransfectadas al 70-80% de confluencia en placas de 10 cm de diámetro mediante el método de fosfato cálcico (Campanero y Flemington, 1997). Para generar las partículas lentivirales se emplearon 20µg de los vectores Mission pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich), 15µg de plásmido empaquetador psPAX2 y 5µg de plásmido codificador de las proteínas de la envuelta del virus pMD2G-VSVG. El vector Mission pLKO.1-puro empleado como control contiene un ARN interferente control (un inserto en horquilla que genera un siARN con un mínimo de 5 bases no complementarias a ningún gen humano o murino conocido; SHC002), o para los ARN interferentes específicos de CDCA7 humano: sh25 (TRCN0000140725), sh40 (TRCN0000139240), sh56 (TRCN0000139556) y sh83 (TRCN0000145183). A las 16 horas de la transfección, las células se lavaron con PBS1X suplementado con 5mM de EDTA y posteriormente con PBS1X. El medio condicionado fue recogido 40 horas después de la transfección y los restos celulares se eliminaron mediante filtración con filtros de 0.45µm. Para infectar las células, éstas se incubaron con las partículas virales en medio RPMI completo con 8µg/ml de sulfato de protamina (DG-75, BL2, Ramos, Toledo y Molt-4) o en medio DMEM completo con 8µg/ml de polibreno (HEK-293T y S1F) durante 16 horas. Las células se lavaron con RPMI 1640 o DMEM para eliminar las partículas virales y las células transducidas fueron seleccionadas en presencia de 1µg/ml de puomicina durante al menos 96 horas.

12. ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN Y CICLO CELULAR.

La proliferación celular fue estimada por incorporación de EdU tras un pulso de 16 horas (DG-75, BL2, Ramos y HEK-293T) empleando el kit Click-iT EdU Alexa fluor 488, Flow Cytometry Assay Kit (n° catálogo C-10425; Life Technologies, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con este fin, las células (5×10^5) se sembraron en placas de 24 pocillos y se determinó la incorporación de EdU Alexa fluor 488 mediante citometría de flujo.

Para el análisis del ciclo celular, las células se lavaron con PBS1X, se fijaron con 70% de etanol, se dejaron a 4°C durante al menos 30 min y se almacenaron a -20°C o/n. Para determinar el contenido de ADN, las células fijadas se lavaron con PBS1X y se incubaron durante 30 min a 37°C en una solución que contenía 38mM de citrato sódico, 69µM de yoduro de propidio y 100µg/ml de ARNasa. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCAN (BDBiosciences) y los datos generados fueron procesados por los programas CellQuestPro y Modfit.

13. ENSAYOS FUNCIONALES DE TRANSFORMACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*.

13.1 - Ensayo de formación de colonias en agar blando.

Se cubrieron placas de cultivo de 6 pocillos con 0.5% de agarosa (Difco™ Agar Noble ref. 214220). Sobre esta base se sembraron por triplicado $2,5 \times 10^4$ células resuspendidas en 0.35% de agarosa (Difco™ Agar Noble). La agarosa se preparó en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Tras 20 minutos a temperatura ambiente se añadió 1 ml de medio que fue reemplazado por medio fresco semanalmente. Las placas se mantuvieron a 37°C en un incubador humidificado en presencia de 5% de CO₂. Al cabo de 2-3 semanas, los ensayos se fijaron con 1% de formaldehído y, tras lavarlos 2 veces con PBS1x, fueron teñidos con 1 ml de 0.05% de cristal violeta durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, tras lavarse varias veces en PBS1x, se contaron visualmente el número de colonias formadas.

13.2 - Análisis de la formación de tumores en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (NOD-SCID).

13.2.1 – Animales.

Para este trabajo se utilizó la cepa de ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J de la producción propia del Servicio de Experimentación Animal del IIBm. La cepa fue incorporada a la instalación con animales procedentes de Charles River laboratories. Los animales de este trabajo fueron estabulados en las instalaciones del propio Servicio, las cuales cumplen los requisitos necesarios para estabular dichas especies, con nº de registro en el Área de Protección animal de la Consejería de Medio ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid **ES280790000188.**,

Las condiciones de estabulación son las siguientes:

Climatización de las salas de animales. Por aire con filtración absoluta (filtros HEPA 99.99%) y 19 renovaciones/hora por sala.

Temperatura. 22±1 °C

Humedad relativa del aire entre 40% y 70%.

Ciclo luz/oscuridad. 12 h/12 h.

Sobrepresión de la sala con respecto al pasillo de 1 atm. Como lecho se utilizó viruta de madera de chopo (Souralit) previamente esterilizada en autoclave, (Matachana modelo 1.637LE-2). Este lecho, siguiendo los protocolos establecidos, se cambia una vez por semana. La alimentación se administró *ad-libitum* con pellets de 12 mm de dieta irradiados (SAFE R03y 112). La bebida se suministró con biberones fabricados en Makrolón con su tetina correspondiente fabricada en acero inoxidable, los cuales se rellenaron de agua de la red previamente filtrada y posteriormente esterilizada en autoclave (Matachana modelo 1.637LE-2). Los ratones fueron mantenidos en las salas específicas de esta especie en estanterías donde se ubicaron las jaulas o cubetas. Se utilizaron Racks Ventilados IVC (individually ventilated caging sistem), sistema que permite un alto número de renovaciones de aire fresco y filtrado (filtración 99.99% HEPA), dando como resultado un bajísimo índice de amoníaco y dióxido de carbono dentro de la jaula (Allentown XJ tipo II larga).

La cubeta totalmente hermética tiene como medidas 214 mm ancho, 401 mm largo y 176 mm alto y cumple la normativa actual ya que dispone de una superficie de 528 cm² permitiendo estabular un máximo de 6 ratones adultos.

13.2.2 – Células.

Para los ensayos de xenotransplante se emplearon células DG-75, BL2, Ramos, Toledo y Molt-4 transducidas con lentivirus control o silenciadores de CDCA7. Se lavaron 2x10⁶ de células con PBS1X 2 veces y se resuspendieron en 100µl de PBS1X. Estas células se inocularon subcutáneamente en los flancos dorsales de hembras NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J (Charles River laboratories) de 6-8 semanas de edad. Al cabo de 3 semanas de la inoculación los tumores se extrajeron y se pesaron.

13.2.3 – Análisis inmunohistoquímico.

Para el análisis inmunohistoquímico de estos tumores se realizó una fijación con 4% de formaldehído en PBS1x, seguido de un lavado en etanol 70% y dejándose las muestras en el mismo medio de lavado para su posterior embebido en parafina. Ambos tratamientos se realizaron durante al menos 16 horas a 4°C. La obtención de los cortes histológicos y su posterior tinción se llevaron a cabo en el servicio de Histología del IIBm. Se obtuvieron cortes de 5 micras de grosor y se realizó una tinción de H&E utilizando hematoxilina de Carazzi y eosina Y.

14. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR IN VITRO.

14.1 Análisis de la migración en “Transwells”.

La capacidad de migración *in vitro* fue determinada mediante el uso de placas permeables “transwell” (Costar® 3415, Corning® Inc), con membranas de un diámetro de poro de 3 µm. Estas membranas fueron recubiertas por su cara inferior con 100µl de 25 µg/ml de fibronectina (F1056; Sigma-Aldrich) en PBS 1x a 37°C durante toda la noche. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se hizo un ligero lavado con agua para quitar el exceso.

Las células DG-75 transducidas se cultivaron en condiciones normales de cultivo sin llegar a confluencia (por debajo de 1×10^6 células/ml), en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Puromicina (P8833; Sigma-Aldrich). A continuación estas células se lavaron 2 veces con RPMI sin suplementar. Estas células se incubaron por duplicado, en este mismo medio, a razón de 0.5×10^6 células/pocillo. Como atrayente, se utilizó medio RPMI suplementado (10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina). Se monitorizó el número de células que habían conseguido atravesar la membrana tras 4 y 24 horas mediante contaje utilizando una cámara de Neubauer (022-718605; Scharlab,S.L). A estos mismos tiempos también se visualizó el número de células retenidas en la membrana mediante fijación con formaldehído 4% (15512; Sigma-Aldrich) en PBS 1x durante 15 minutos a temperatura ambiente y posterior tinción con DAPI (D1306; Life Technologies).

14.1 Análisis de la motilidad celular “*Video lapse assay*”.

La capacidad de motilidad *in vitro* fue determinada mediante el uso de cámaras “ μ -Slide” (Ibidi, 80821). Estas cámaras fueron recubiertas con 300 μl de 25 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina (F1056; Sigma-Aldrich) en PBS 1x a 37°C durante toda la noche. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se hizo un ligero lavado con agua para quitar el exceso.

Las células DG-75 transducidas se cultivaron en condiciones normales de cultivo sin llegar a confluencia (por debajo de 1×10^6 células/ml), en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Puromicina (P8833; Sigma-Aldrich). Estas células se incubaron por duplicado en RPMI suplementado con 10% FBS, a razón de 7.5×10^4 células/pocillo. El movimiento de estas células se monitorizó durante 4 horas a razón de una foto cada 2 minutos empleando un equipo cell observer (Microscope Observer Z1). El software utilizado para la adquisición fue “*Imaging software Axiovision 4.8*”. Las fotos se realizaron utilizando la cámara del equipo “*Camera Cascade 1k*” y el objetivo usado fue el de 10x (Plan APOCHROMAT de Zeiss). Las trayectorias fueron analizadas y cuantificadas con los plugins del programa Fiji/ImageJ (versión 1.47g) “*Manual Tracking*” y “*Chemotaxis tool*”.

15. ENSAYOS DE INVASIÓN CELULAR IN VIVO.

Este ensayo se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Las células DG-75 transducidas se cultivaron en condiciones normales de cultivo sin llegar a confluencia (por debajo de 1×10^6 células/ml), en presencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de Puromicina (P8833; Sigma-Aldrich). Estas células fueron teñidas con el colorante CellTracker™ CM-DiI (Life Technologies). Entonces fueron inoculadas dentro del saco vitelino de 30-50 larvas de 2 días de pez cebra ($100\text{-}150$ células/larva). Después de 8 horas se determinó si las células habían conseguido salir del saco vitelino. Aquellas larvas en las que más de 5 células habían logrado salir del saco vitelino, fueron consideradas como positivas para invasión/migración. Con estos datos se calculó el porcentaje de larvas positivas para invasión.

16. INMUNOFLUORESCENCIA.

Los ensayos de inmunofluorescencia se llevaron a cabo sobre cubres de 12 mm tratados con $100 \mu\text{l}$ de $25 \mu\text{g/ml}$ de fibronectina (F1056, Sigma-Aldrich) en PBS 1x a 37°C durante toda la noche. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se hizo un ligero lavado con agua para quitar el exceso.

Las células DG-75 transducidas con los distintos shRNA fueron lavadas 2 veces con RPMI sin suero y resuspendidas en el mismo medio. $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de células (1×10^5) fueron sembrados sobre los cubres e incubadas durante 1 hora a 37°C . Los cubres fueron lavados con PBS 1x y las células adheridas fueron fijadas (4% formaldehído, 4% sacarosa en PBS 1x) durante 15 min a 37°C . Tras lavar con PBS 1x, las células fueron permeabilizadas con 0.1% Triton-X100 en PBS1x durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS 1x, se trataron las muestras con una solución de bloqueo (5% BSA, 5% Suero de oveja en PBS 1x) y se mantuvieron en una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS 1x, se añadió el anticuerpo primario anti-CDCA7 S99 y Alexa Fluor® 546 Phalloidin (1/500) (Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras lavar con PBS 1x, se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG, Life Technologies) y DAPI ($5 \mu\text{g/ml}$) (Molecular Probes®, Life

Technologies) durante 1 hora en oscuridad. Tras lavar en PBS 1x, los cubres se lavaron con agua Mili-Q para eliminar las sales y seguidamente se montaron sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje (ProlongGold antifade reagent, Invitrogen). Las preparaciones fueron analizadas en el servicio de Microscopía Confocal del IIBm y las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal invertido láser Zeiss LSM5 con un objetivo de inmersión en aceite de 63x Plan-Apocromático y se normalizaron para cada color por separado. Las imágenes de confocal presentadas son secciones individuales de una serie Z o proyecciones máximas de dos dimensiones. Estas imágenes se procesaron para la presentación con Zeiss LSM5 Image Browser y Adobe Photoshop.

17. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

17.1 Immunoprecipitation.

Las células fueron lavadas 2 veces en PBS 1x y lisadas mediante su incubación durante 1h a 4°C en un tampón de lisis que contenía 20mM Hepes, pH 7.9; 1 mM EDTA; 250 mM NaCl; 25% glicerol; 0.5% NP40; 1 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 1 µg/ml leupeptina; 1 µg/ml pepstatina; 1 µg/ml bestatina y 2 µg/ml aprotinina. Tras la eliminación del material insoluble, se redujo la concentración de NaCl a 150 mM empleando el mismo tampón de lisis, pero sin NaCl. La concentración de proteína fue estimada por el método de Lowry usando el kit “DcProtein Assay” (Bio-Rad laboratories). El lisado proteico (10 mg) fue pre-aclarado con 60 µl de proteína A-Sefarosa (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 4°C seguido de una incubación con el suero anti-CDCA7 S99 o con el suero control preinmune durante toda la noche a 4°C. A continuación se añadieron 30µl de una suspensión de proteína A-Sefarosa previamente bloqueada con 0,5% BSA y se incubó durante 1 hora a 4°C en rotación constante. Los inmunoprecipitados fueron lavados 6 veces con tampón de lavado (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150mM NaCl; 0,5% NP40; 0,5% BSA) y una vez con 50 mM Tris-HCl, pH 6.8. Las muestras inmunoprecipitadas fueron divididas para análisis por inmunoblot (10%) y para tinción con plata (90%). Las proteínas unidas fueron eluidas por hervido en tampón de carga SDS durante 10 minutos antes de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

17.2 Western blot.

El 10% de los extractos inmunoprecipitados fueron fraccionados por electroforesis en gel del 10% de SDS-poliacrilamida y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con TBS1X suplementado con 2% de suero fetal bovino y 5% de leche en polvo desnatada, se hibridó con el suero de conejo S99 anti-CDCA7 (1:5000), seguido de sonda HRP anti-conejo (ImmunocruzTM IP/WB Optima E, Santa Cruz Biotechnology), que reconoce preferentemente la inmunoglobulina no desnaturalizada. La señal de los anticuerpos fue revelada mediante quimioluminiscencia (Western Lightning Chemilunescence Reagent Plus; Thermo Fisher Scientific Inc.) y exposición de la membrana a una película médica de rayos X.

17.3 Teñido con plata.

El 90% de los extractos inmunoprecipitados fue dividido en partes iguales para ser fraccionado en geles de 8% y del 12% de SDS-poliacrilamida. Los geles fueron teñidos con plata usando un protocolo compatible con un análisis posterior de espectrometría de masas MALDI-MS. El método de tinción consistió en los siguientes pasos: Tras la electroforesis, las proteínas separadas dentro del gel fueron fijadas durante 30 minutos en 250 ml de una solución con 40% etanol, 10% ácido acético. Estos geles fueron humedecidos durante 30 minutos en 250 ml de solución de sensibilización (30% etanol, 0.2% w/v tiosulfato de sodio and 6.8% w/v acetato de sodio); lavados 3 veces con abundante agua destilada durante 5 minutos cada lavado; humedecidos en una solución de 250 ml de nitrato de plata (0.25% w/v); lavados 2 veces durante 1 minuto con agua destilada e incubados con una solución de revelado (2.5% w/v carbonato de sodio, 0.0148% w/v formaldehído) hasta que las bandas aparecieron con suficiente intensidad (3-5 minutos). Una vez alcanzada la intensidad deseada, el revelado fue detenido por adición de 250 ml de solución de parado (1.46% w/v EDTA-Na₂·2H₂O) durante 10 minutos. Los geles fueron suavemente agitados en un balancín durante los pasos de tinción. Todas las disoluciones fueron preparadas utilizando agua destilada. Las soluciones de fijación, sensibilización, revelado y parada fueron preparadas previamente pero el formaldehído fue añadido justo antes de su uso así como la solución de nitrato de plata que fue preparada en el momento de uso. El tratamiento con el nitrato de plata fue realizado bajo la iluminación de la habitación. Los geles fueron siempre manipulados llevando ropa protectora para minimizar la

contaminación con queratinas. Se utilizó etanol absoluto y acetato sódico (anhidro) de Merck; ácido acético (glacial) de BDH prolabo; formaldehído (37% w/v) de GE Healthcare; tiosulfato de sodio (Reagentplus, 99%), Carbonato sódico (A.C.S. reagent, 99.95-100.05%), nitrato de plata (A.C.S. Reagent, 99%) y EDTA-Na₂·2H₂O (ACS reagent, 99.0-101.0%) de Sigma-Aldrich.

17.4 Preparación de las muestras y digestión de proteínas en gel.

Las bandas de interés de los geles SDS-PAGE teñidos con plata fueron cortadas manualmente, depositadas en una placa de 96 pocillos y procesadas automáticamente empleando un equipo proteomeer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). El protocolo de digestión usado estaba basado en (Shevchenko *et al.*, 1996) con variaciones menores: los trozos de gel se lavaron en primer lugar con bicarbonato de amonio 50 mM y en segundo lugar con acetonitrilo (ACN) antes de la reducción con DTT 10 mM en una solución de bicarbonato de amonio 25 mM. La alquilación se llevó a cabo con 55 mM de yodoacetamida en 50 mM de solución de bicarbonato de amonio. Los trozos de gel se enjuagaron a continuación en primer lugar con bicarbonato de amonio 50 mM, y en segundo lugar con ACN, y luego se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Se añadió Tripsina (proteomics grade, Sigma, CA, EE.UU.) a una concentración final de 16 ng/l en el 25% mM de solución de bicarbonato de amonio ACN/50 y la digestión se llevó a cabo a 37 °C durante 4 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 0.5% de ácido trifluoroacético para la extracción de los péptidos. Los péptidos tripticos eluidos fueron secados por centrifugación en un speed-vacuum y resuspendidos en 4 µl de solución de MALDI (30% acetonitrilo/15% isopropanol/0.1% ácido trifluoroacético). Se depositó una alícuota de 0.8 µl de cada péptido en una placa de 386 pocillos OptiTOFTM (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) y se dejó secar a temperatura ambiente. Entonces se depositó una alícuota de 0.8 µl de solución de matriz (3 mg/mL α -cyano-4-hidro-cinnamic acid en solución de MALDI) sobre la digestión seca y se dejó secar a temperatura ambiente.

17.5 Huella dactilar de la masa del péptido MALDI, análisis MS/MS y búsqueda en la base de datos.

Para el análisis MALDI-TOF-TOF, las muestras fueron automáticamente procesadas en un espectrómetro de masas ABi 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) en modo de ion positivo reflector (el voltaje de aceleración de iones fue de 25 kV en modo de adquisición MS y de 2 kV en modo MSMS) y los espectros obtenidos se almacenaron en el ABi 4000 Series Explorer Spot Set Manager. PMF y MSMS. Los espectros PMF y MSMS se corrigieron utilizando rutinas incorporadas en ABi 4000 Series Explorer Software v3.6. Cada espectro PMF fue internamente calibrado con la señal de las masas de iones de autólisis de tripsina para llegar a una masa de medición precisa típica de < 25 ppm. Conociendo las señales de masa de la tripsina y de la queratina, así como el potencial de los aductos de sodio y potasio (+21 Da y +39 Da), estos datos fueron eliminados de la lista de picos.

Para enviar los datos combinados de PMF y MS/MS para MASCOT software v.2.2.04 (Matrix Science, London, UK), se utilizó el GPS Explorer v4.9 para realizar la búsqueda en la base de datos NCBIInr. Para la búsqueda se usaron los siguientes parámetros: enzima, tripsina; permitir rupturas perdidas, 1; carbamidometil cisteína como modificación fijada por el tratamiento con iodoacetamida; modificaciones variables, oxidación de la metionina; tolerancia de masa para precursores se fijó en ± 50 ppm y para los fragmentos iónicos de MS/MS ± 0.3 Da. El intervalo de confianza para la identificación de proteínas se ajustó a $\geq 95\%$ ($p < 0.05$) y sólo péptidos con una puntuación de ion individual por encima del umbral de identidad se consideraron correctamente identificados.

La digestión en gel de las proteínas, la preparación de las muestras, la adquisición de las huellas dactilares peptídicas MALDI, el análisis de MS/MS y la búsqueda de bases de datos han sido llevados a cabo por la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid), el cual está integrado en la Plataforma Carlos III en red Proteómica, ProteoRed-ISCI.

18. ENSAYOS DE RESISTENCIA A LA APOPTOSIS.

Las células DG-75 transducidas con los distintos shRNA se crecieron en condiciones normales de cultivo, sin llegar a confluencia (por debajo de 1×10^6 células/ml), en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Puomicina (P8833; Sigma-Aldrich). Tras selección en puomicina, se lavaron 2 veces con PBS1x y se resuspendieron en medio de cultivo a razón de 1×10^6 células por pocillo en un volumen final de 2 ml. Cada pocillo se trató con una condición diferente de privación de suero o de resistencia a droga.

18.1 Ensayo de privación de suero.

Para este ensayo las células se resuspendieron en RPMI suplementando con cantidades decrecientes de suero 10%, 5%, 2%, 0.5%, 0.1% y 0% y se analizó su viabilidad por incorporación de yoduro de propidio a 24h, 48h y 72h. Para la tinción, las células se lavaron en PBS 1x y se resuspendieron en 500 μl de una solución de yoduro de propidio (10mM de citrato sódico, 17 μM de yoduro de propidio) en PBS 1x. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCAN (BDBiosciences).

18.2 Ensayo de resistencia a tratamiento con drogas.

Para este ensayo las células se resuspendieron en 10mU/ml o 50mU/ml de bleomicina (Bleomycin sulfate, Sigma-Aldrich B8416) y se analizó su perfil de ciclo celular (población sub G0) por incorporación de yoduro de propidio a 0h, 24h y 48h. Para el tratamiento con cisplastino las células se resuspendieron en 10 $\mu\text{g/ml}$ o 25 $\mu\text{g/ml}$ de Cisplatino (*cis*-Diammineplatinum(II) dichloride, Sigma-Aldrich P-4394) y se analizó el perfil de ciclo celular (población sub G0) a 0h, 24h, 48h, y 72h. El análisis de ciclo celular esta explicado en el punto 12 de esta sección.

RESULTADOS

1. LA EXPRESIÓN DE CDCA7 SE ENCUENTRA ELEVADA Y PRESENTA UN PAPEL ONCOGÉNICO.

1.1. Las líneas celulares de linfoma de Burkitt muestran niveles de expresión de CDCA7 elevados en comparación con líneas simplemente immortalizadas.

Uno de los objetivos principales de este trabajo era la identificación de genes capaces de mediar en el proceso de transformación tumoral más allá del paso de la immortalización replicativa. Para ello decidimos comparar los perfiles de expresión génica de linfocitos B inmortales, pero no tumorales, con linfocitos B completamente malignizados. Como modelo de linfocitos B “solamente” inmortales empleamos líneas celulares linfoblastoides B (LCL) obtenidas mediante la infección de células B normales procedentes de individuos sanos con el virus de Epstein-Bar (EBV). Como ya se ha mencionado en la Introducción, estas células han alcanzado la inmortalidad replicativa, pero no son capaces de crecer con independencia de las señales de anclaje y no forman tumores en ratones inmunodeficientes (Pajic *et al.*, 2000). Como modelo de linfocitos B completamente malignizados decidimos emplear líneas celulares de linfoma de Burkitt (BL) portadoras o no del EBV.

Mediante análisis de la expresión génica con Microarrays, comparamos el transcriptoma de un “pool” de 3 líneas de LCL (X50-7, IB-4 y Dana) con el de 2 líneas celulares de BL portadoras del EBV (Akata y Mutu-I) y el de 3 líneas celulares de BL no portadoras de este virus (DG-75, Ramos y BL2) (Fig. 8A). En este análisis encontramos más de 1.600 genes expresados diferencialmente entre BL y LCL con una significación estadística de $P < 0.05$. Estos datos de expresión están disponibles en “Gene Expression Omnibus del National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) a través del número de accesión GEO GSE41865 o mediante el link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE41865>. La clasificación funcional de este listado de genes mediante el software PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) indicó que las mayores diferencias de expresión entre BL y LCL corresponden a genes que participan en las categorías de procesos celulares (ciclo celular, adhesión celular, organización de componentes celulares y motilidad celular), comunicación celular (señalización célula-célula y transducción de señales) y procesos metabólicos primarios (metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y metabolismo de ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos y bases

nitrogenadas) (Fig. 8B). Para ayudar a encontrar los genes que pudieran ser más relevantes en la transformación maligna nos centramos en los que presentaban una expresión diferencial superior a 3 veces (543 genes) y de éstos seleccionamos los 100 genes con mayor significación estadística. Solo 7 de estos genes se encontraban sobreexpresados en BL (Fig. 8C). La comparación de los transcriptomas mostraba que las líneas de BL eran muy similares entre ellas, independientemente de la presencia del EBV (Fig. 8D). Tras una revisión bibliográfica de la información publicada sobre estos genes y analizar los procesos biológicos atribuidos a ellos, seleccionamos 2 posibles reguladores transcripcionales, *ID3* y *CDCA7*, por su posible potencial regulador de programas de expresión génica necesarios para la transformación maligna.

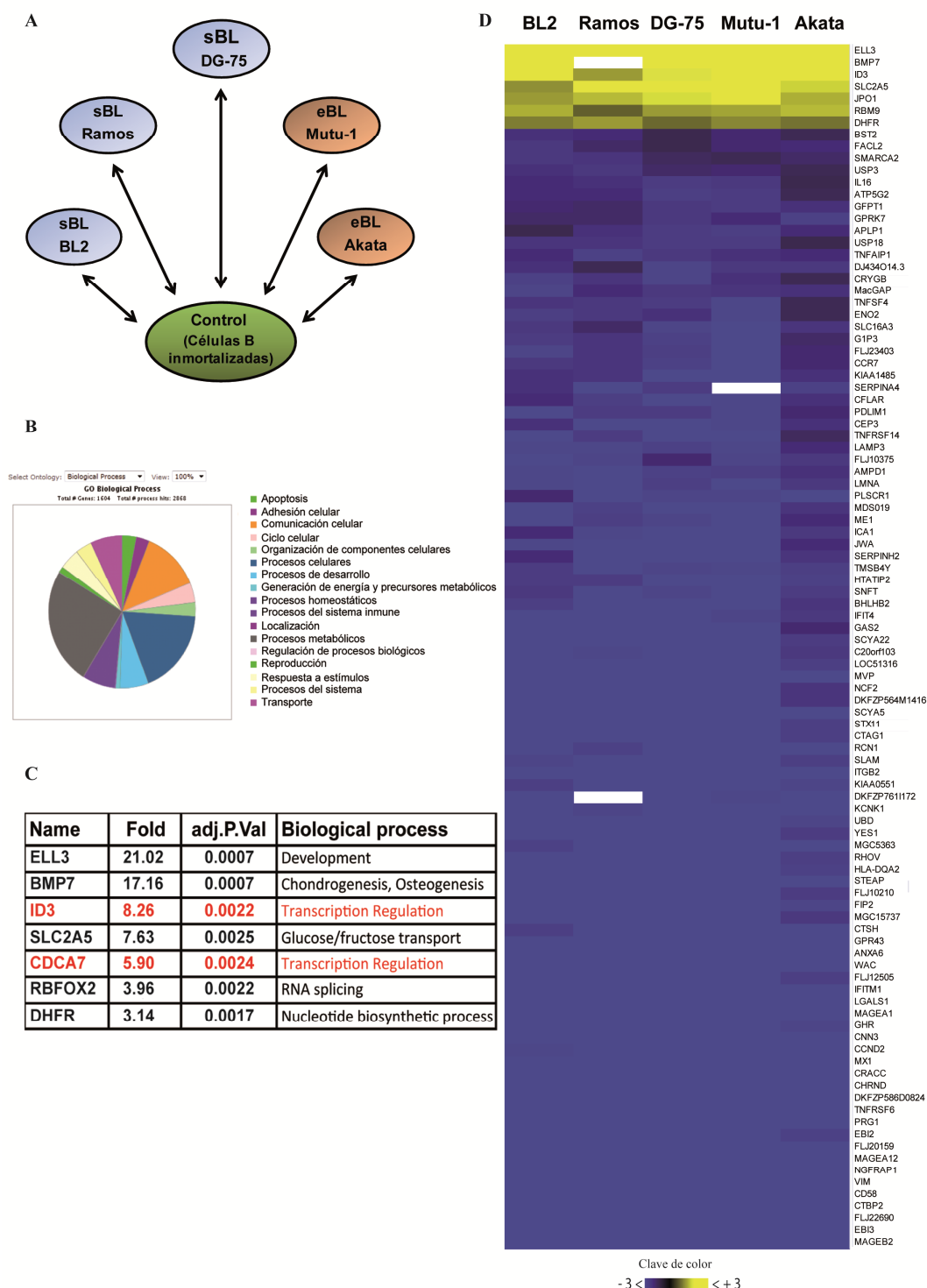
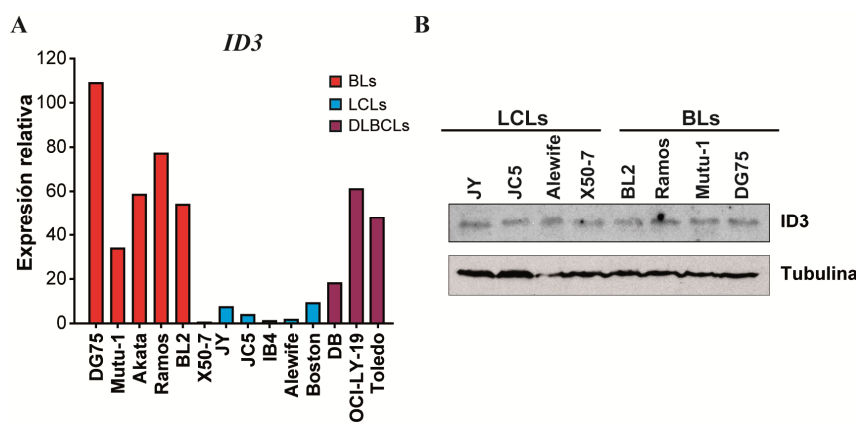


FIGURA 8. Los perfiles de expresión entre BL y LCL son distintos, especialmente a nivel de procesos metabólicos y comunicación celular. (A) Diseño experimental del microarray en el que se comparan las líneas celulares de BL esporádico BL2, Ramos y DG-75 y de BL endémico Mutu-1 y Akata con un pool de las líneas de LCL (X50-7, IB4 y Dana). (B) Clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en el análisis de microarray mediante el software PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships). (C) Se muestran los valores de veces de expresión (*Fold change*), valor de P ajustado (*adj. P. Val.*) y proceso biológico (Biological process) en el que están implicados los 7 genes sobreexpresados del conjunto de 100 genes regulados más de 3 veces y con mayor significación estadística. (D) Se muestran los niveles de expresión en amarillo (inducidos) y en azul (reprimidos) de los 100 genes regulados >3 veces y con mayor significación estadística en las líneas de BL indicadas con respecto al pool de células control.

La sobreexpresión de *ID3* en BL respecto a las células inmortales (LCLs) fue confirmada posteriormente mediante PCR cuantitativa (Fig. 9A). También se analizaron los niveles de expresión de *ID3* en 3 líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) encontrándose que también estaba sobreexpresado en ellas (Fig. 9A). Para este análisis se utilizó la línea celular IB4 como referencia y β -Actina como estándar endógeno. Sin embargo, debido a que los inmublots para *ID3* sugerían que su expresión es similar entre células inmortales y las de linfoma B (Fig. 9B), abandonamos el estudio de esta proteína.



Nuestro segundo candidato, *CDCA7*, es un gen que había sido descrito como una diana transcripcional de C-MYC y de E2F (Prescott *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2006). Existen dos isoformas para esta proteína, *CDCA7-1* y *CDCA7-2*, generadas por ajuste alternativo del mensajero. Se analizó en primer lugar la expresión general de *CDCA7* en 5 líneas de BL y 6 de LCL. Este análisis validó el resultado del microarray al mostrar que *CDCA7* presentaba altos niveles de expresión en todas las líneas de BL analizadas en comparación con las líneas LCL (Fig. 10A). A continuación determinamos mediante RTq-PCR y Northern blot la contribución de cada isoforma a las diferencias detectadas con la sonda común. Observamos que la expresión de *CDCA7-2* es mucho más elevada que la de *CDCA7-1* en todas las células analizadas y ambas isoformas son mucho más abundantes en BL que en LCL (Fig. 10B y C).

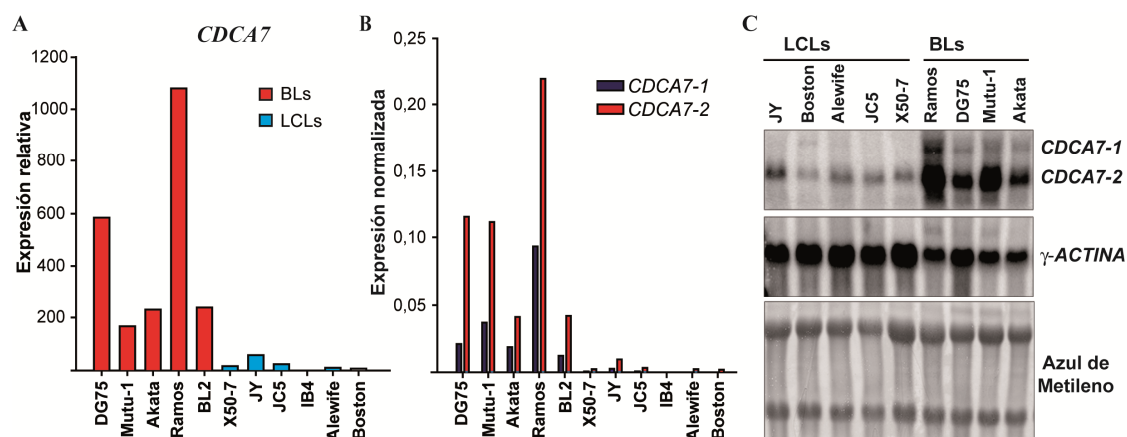


FIGURA 10. La expresión de *CDCA7* es más elevada en líneas celulares de BL que en las LCL. (A) Análisis de la expresión de *CDCA7* mediante RTq-PCR en las líneas celulares indicadas normalizada para la expresión de β -Actina. Se muestra la expresión relativa a la de la línea celular IB4. (B) Análisis de los niveles de expresión de *CDCA7-1* y *CDCA7-2* en las líneas celulares indicadas mediante RTq-PCR (datos normalizados con β -Actina) y (C) mediante Northern blot empleando una sonda común a las dos isoformas de *CDCA7* o una sonda para γ -ACTINA. También se muestra la tinción de la membrana con azul de metileno.

Dado que los anticuerpos comerciales para *CDCA7* no mostraban resultados reproducibles fiables, generamos un antisuero policlonal de conejo (S99) contra un epítipo de la proteína presente en ambas isoformas. Para poder confirmar la especificidad del antisuero obtenido construimos unos plásmidos para sobreexpresar *CDCA7-1* y *CDCA7-2* en células HEK-293T. La isoforma de *CDCA7-2* fue clonada mediante métodos tradicionales de clonaje. Sin embargo, la isoforma larga no pudo ser clonada directamente mediante RT-PCR y tuvimos que recurrir a una estrategia alternativa descrita en la sección de Materiales y Métodos.

El análisis mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-HA de extractos proteicos de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pCDNA3-HA-*CDCA7-1* y pCDNA3-HA-*CDCA7-2* mostraba la expresión ectópica de las isoforma larga y corta de *CDCA7* en los tamaños de 60 KDa y 47 Kda, respectivamente (Fig. 11A). La hibridación con el antisuero S99 mostraba dos bandas en las mismas posiciones que las reconocidas por el anticuerpo anti-HA (Fig. 11B), sugiriendo que detecta las dos isoformas de *CDCA7*. Además, empleando extractos de las líneas celulares JC5 (LCL) y Ramos (BL) observamos que el antisuero S99 detectaba una proteína del tamaño de *CDCA7-2* más abundante en Ramos (Fig. 11C). Es de destacar que la detección de esta proteína se

inhibía al neutralizar el antisuero S99 con el péptido empleado para la inmunización (Fig. 11D).

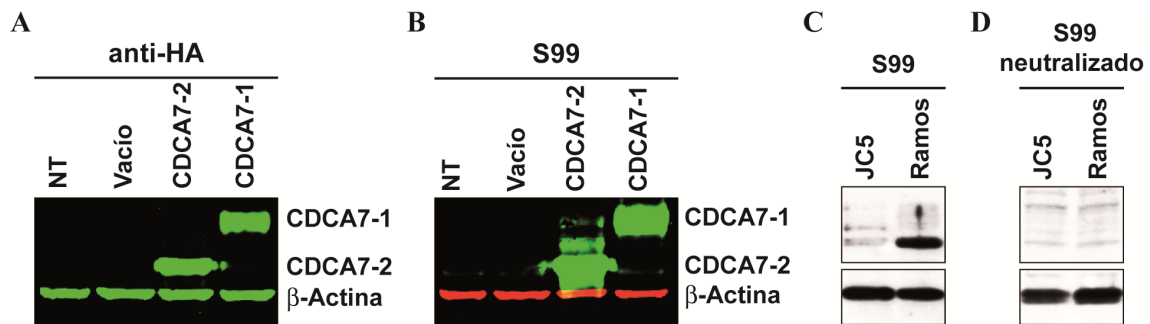


Figura 11. Verificación de la especificidad del antisuero S99. Los extractos proteicos de células HEK-293T no transfectadas (NT) o transfectadas con los plásmidos de sobreexpresión de las isoformas de CDCA7 fusionadas al Tag HA o con el plásmido vacío, fueron analizados mediante inmunoblot usando (A) el anticuerpo anti-HA o (B) el antisuero S99 respectivamente. C) Inmunoblot de extractos de BLs y LCLs usando el antisuero S99 neutralizado o no con el péptido usado para la inmunización. β-ACTINA fue usada como control de carga.

Para confirmar que el antisuero S99 reconoce específicamente CDCA7, decidimos llevar a cabo experimentos de silenciamiento génico mediante interferencia de ARN (shRNA) utilizando vectores lentivirales. Para ello hicimos un "screening" de 4 shRNAs dirigidos contra distintas regiones del ARNm de *CDCA7* y determinamos la eficiencia de silenciamiento mediante RTq-PCR empleando una sonda común para las dos isoformas de *CDCA7* (Fig. 12A) y sondas específicas de cada isoforma (Fig. 12B y C). Los resultados obtenidos mostraban que los shRNAs más eficientes fueron en este orden: sh25, sh83, sh40 y sh56. En base a estos resultados decidimos utilizar para nuestros experimentos de silenciamiento los interferentes sh25 y sh83 preferentemente.

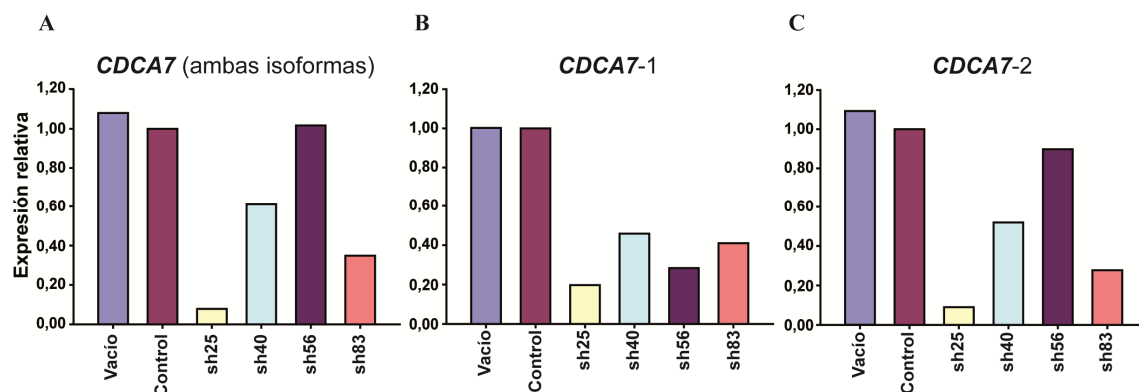


Figura 12. Escrutinio de los shRNAs más eficientes para el silenciamiento de CDCA7. Análisis mediante RTq-PCR de los niveles de expresión de *CDCA7* en células DG-75 transducidas con 5 diferentes shRNAs. A) Se determinaron tanto los niveles generales de expresión de *CDCA7*, como de sus isoformas B) corta y C) larga (los datos obtenidos están referidos al control y cómo gen endógeno se utilizó TBP).

Empleando extractos proteicos de células DG-75 (BL), la proteína detectada por el antisuero S99 con movilidad de CDCA7-2 dejaba de detectarse en células transducidas con el lentivirus portador del shRNA sh25 (Fig. 13A). En cambio, la proteína reconocida por el anticuerpo anti-CDCA7 HPA005565 (Sigma-Aldrich) con movilidad similar a CDCA7 seguía estando presente en extractos de células DG-75 en las que se había silenciado CDCA7 (Fig. 13B). En conjunto, nuestros datos confirman que el antisuero S99 reconoce específicamente a CDCA7.

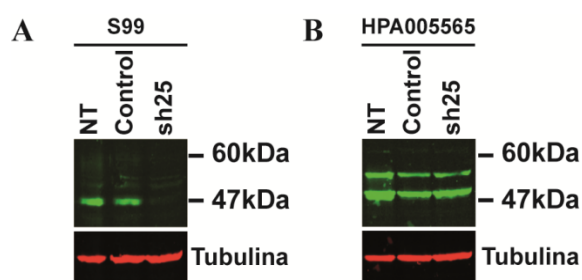


Figura 13. El suero S99 detecta diferencias de expresión de CDCA7 entre células control y silenciadas. Análisis mediante inmunoblot de los niveles de expresión de CDCA7 en células DG-75 no transducidas (NT) o transducidas con lentivirus portadores de shRNA control o shRNA25 empleando (A) el antisuero S99 y (B) el anticuerpo anti-CDCA7 HPA005565. La expresión de Tubulina se muestra como control de carga.

Una vez confirmada la especificidad del suero S99, decidimos emplearlo para comparar la expresión de CDCA7 en células inmortales y células malignas. Para ello empleamos extractos proteicos de las líneas celulares de LCL JY, Alewife, JC5 y X50-7 y de las líneas de BL BL2, Ramos, Mutu-1 y DG-75. Nuestros resultados mostraron que las células tumorales expresaban niveles mucho más elevados de CDCA7-2 que las células inmortales y que la isoforma CDCA7-1 no podía detectarse apenas en ninguna de estas células (Fig. 14). Estos datos son consistentes con los de expresión de RNA observados.

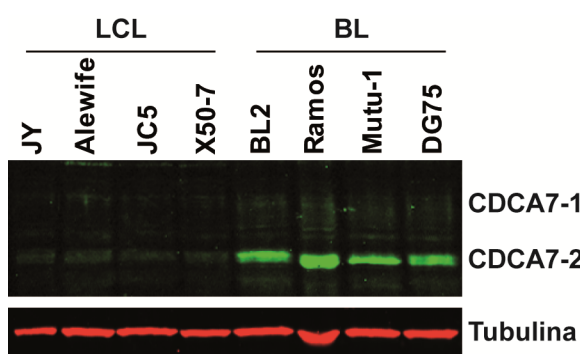


Figura 14. El suero 99 detecta diferencias de expresión de CDCA7 entre BL y LCL. Análisis mediante inmunoblot de los niveles de expresión de CDCA7 en las líneas celulares indicadas de BL y LCL. La expresión de Tubulina se muestra como control de carga.

1.2. La expresión de CDCA7 se encuentra elevada en biopsias de pacientes de linfoma de Burkitt esporádico en comparación con tejidos control.

Se analizó la expresión de *CDCA7* en 3 muestras de tejidos control (Amígdalas reactivas) y 20 biopsias de pacientes con linfoma de Burkitt esporádico mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Estas muestras fueron obtenidas de la Red Española del Banco de Tumores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Mientras que la expresión de *CDCA7* era muy similar entre las muestras de tejidos control, el 100% de las biopsias de pacientes de BL analizadas mostraron niveles de expresión de ARNm de *CDCA7* superiores (entre 2,5 y 140 veces) a los del tejido control (Fig.15A).

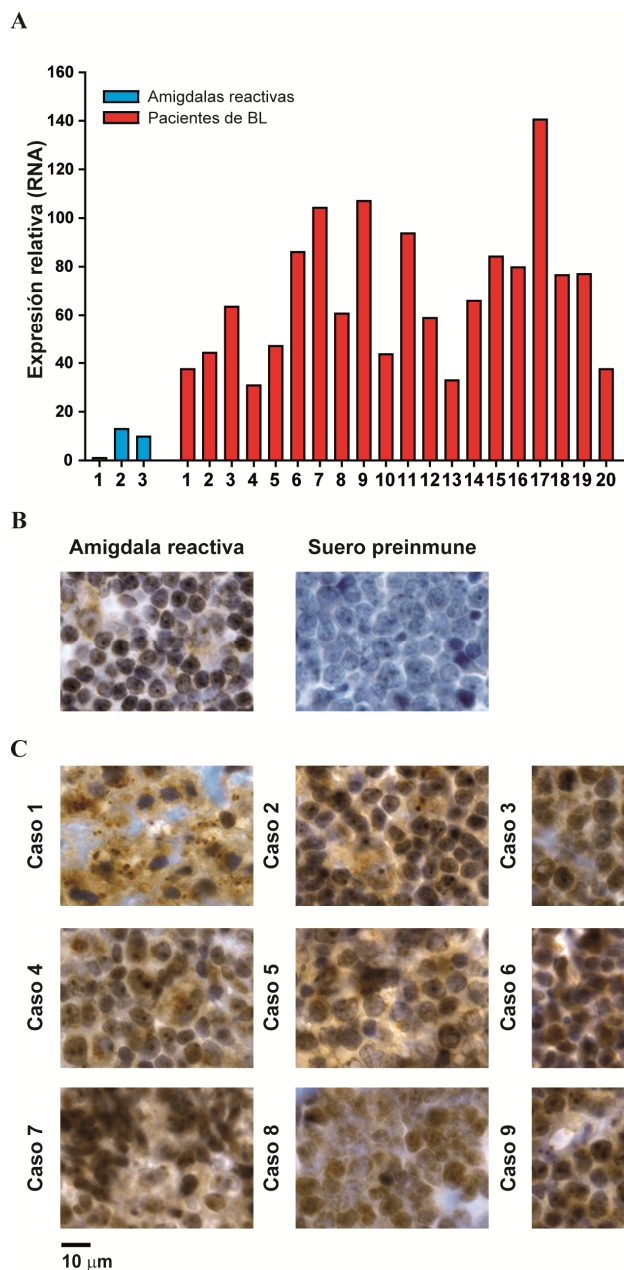


FIGURA 15. La expresión de CDCA7 es más elevada en biopsias de pacientes de BL que en muestras control. (A) Análisis de la expresión de *CDCA7* mediante RTq-PCR en 20 muestras de pacientes de BL y 3 muestras de amígdalas reactivas. Los datos fueron normalizados para la expresión de β -Actina y se muestran relativos a la muestra número 1 de amígdala reactiva. **(B-C)** Imágenes representativas de la expresión de *CDCA7* en (B) una sección del centro germinal de una amígdala reactiva y en (C) secciones de los casos indicados de BL. Una sección de un caso de BL teñido con el suero preinmune se muestra como control en (B).

Para comprobar que los niveles de proteína CDCA7 también eran más elevados en biopsias de pacientes que en los tejidos control, analizamos su expresión mediante inmunohistoquímica. El antisuero S99 y su correspondiente suero preinmune fueron empleados para teñir biopsias de pacientes de BL y, como control, el centro germinal de amígdalas reactivas. Este tejido fue usado como control porque contiene una población de linfocitos B enriquecida en células en estado proliferativo. Los resultados obtenidos confirmaron que la expresión de CDCA7 se encontraba elevada en todos los casos de BL analizados con respecto a centros germinales de amígdalas reactivas (Fig. 15 B). Estos datos evidencian una concordancia con los resultados obtenidos empleando líneas celulares de BL y LCL.

1.3. La expresión elevada de CDCA7 en células de linfoma de Burkitt es necesaria para el mantenimiento de su fenotipo tumoral.

Las células tumorales tienen la capacidad de crecer con independencia de anclaje en un sustrato semisólido y de generar tumores en ratones inmunodeficientes. En cambio, las líneas celulares de LCL (inmortales, pero no tumorales) no presentan ninguna de estas capacidades (Nilsson *et al.*, 1977).

Para determinar si la expresión elevada de CDCA7 en células tumorales es necesaria para el mantenimiento de un fenotipo maligno, utilizamos la línea celular DG-75, derivada de un paciente de BL (Ben-Bassat *et al.*, 1977). En esta línea celular disminuimos la expresión de CDCA7 mediante interferencia de ARN y a continuación analizamos su capacidad de crecer independientemente de anclaje y de formar tumores en ratones inmunodeficientes (NOD-SCID). Para ello se infectaron células DG-75 con lentivirus portadores de un shRNA control (sin diana en el genoma humano o de ratón), o portadores de shRNA específicos de *CDCA7* (sh25 y sh83). Las células transducidas fueron seleccionadas en cultivo con puromicina durante 3-6 días y se determinó la expresión de *CDCA7* en las células infectadas mediante RTq-PCR e inmunoblot. Los shRNA sh25 y sh83 redujeron la expresión de ARNm de *CDCA7* más del 80% en comparación con el lentivirus control (Fig. 16A) y produjeron una marcada inhibición de la expresión de su proteína (Fig. 16B).

Para determinar su capacidad de crecimiento independiente de anclaje se realizaron ensayos de formación de colonias en agar blando. En estos ensayos se observó que las células DG-75 portadoras del shRNA control formaron colonias en agar blando de forma eficiente, mientras que las células transducidas con sh25 y sh83 presentaron una notable inhibición de la capacidad de formación de colonias en comparación con las anteriores (Fig. 16C y D).

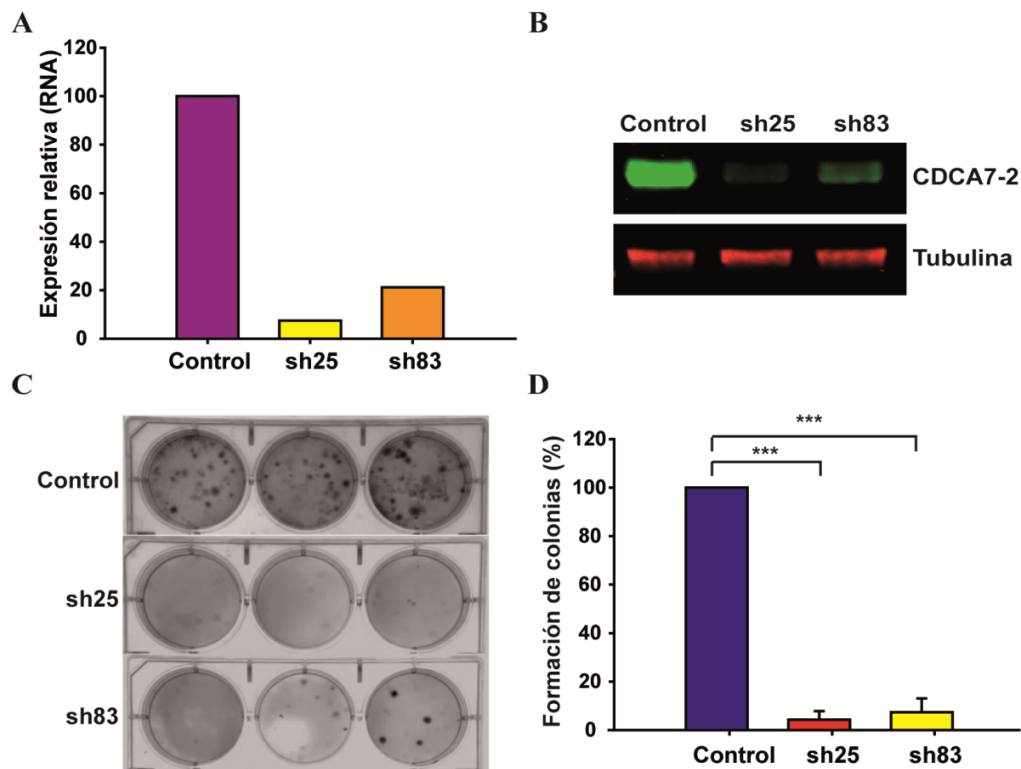


FIGURA 16. La inhibición de la expresión de CDCA7 en células DG-75 mediante interferencia de RNA reduce su capacidad de crecimiento independiente de anclaje. (A) Análisis mediante RTq-PCR de los niveles de expresión de *CDCA7* en la línea celular DG-75 transducida con lentivirus sh-control, sh25 y sh83. Se muestra la expresión normalizada para el gen *18S* y relativa a las células transducidas con sh-control. (B) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión de *CDCA7* en células transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83. (C) Imágenes representativas de un ensayo de agar blando donde se muestran pocillos con células DG-75 transducidas con los shRNA indicados y (D) cuantificación del número de colonias formadas en 4 experimentos independientes en relación a las formadas por células DG-75 transducidas con el shRNA control (media±SEM). Tratamiento estadístico, One-Way ANOVA con Bonferroni post-test; ***P<0.001.

Para determinar la contribución de la expresión elevada de *CDCA7* en la capacidad de las células malignas para formar tumores *in vivo*, inoculamos células DG-75 transducidas con los distintos lentivirus portadores de los shRNA control, sh25 y sh83 en ratones inmunodeficientes NOD-SCID. Las células DG-75 portadoras del shRNA control dieron lugar a la aparición de tumores subcutáneos a las 3 semanas de la inoculación (Fig.

17A). Estos tumores consistían en masas sólidas (Fig. 17B) formadas por células linfoides tumorales (Fig. 17C), con un peso superior a 0.5 g (Fig. 17D) y una elevada expresión de la proteína CDCA7, tal como indica el inmunoblot de extractos obtenidos a partir de los xenografts (Fig. 17E). Sin embargo, las células portadoras de los shRNA sh25 o sh83, no produjeron tumores o generaron tumores pequeños comparados con las células portadoras de los shRNA control (Fig. 17D). Es de destacar que en los tumores formados con células silenciadas, la expresión de CDCA7 se mantenía más baja que en los tumores formados por las células control (Fig. 17E).

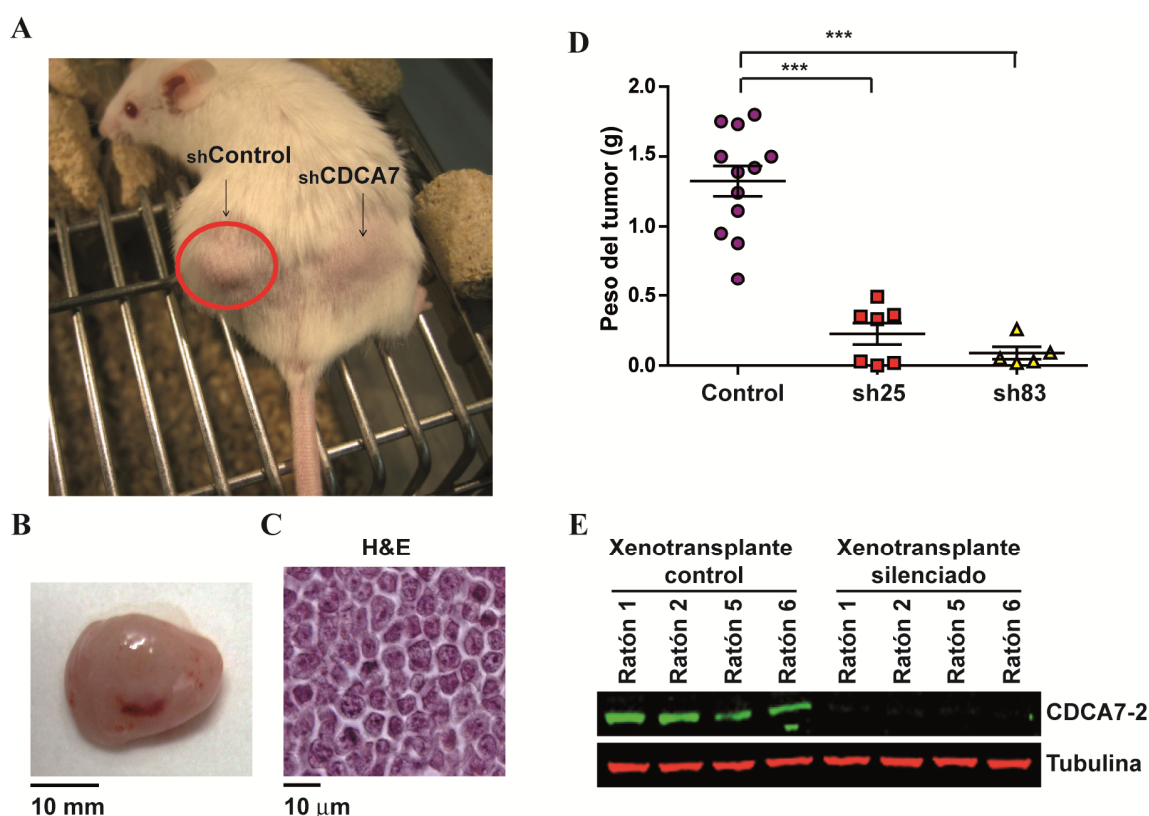


FIGURA 17. La expresión elevada de CDCA7 en la línea celular de sBL DG-75 es necesaria para la formación de tumores en ratones NOD-SCID. (A) Imágenes representativas de un ratón portando la masa tumoral formada por células DG-75 transducidas con lentivirus portadores de shRNAs control (flanco izquierdo) y shRNAs para CDCA7 (flanco derecho). (B) Masa tumoral formada por células DG-75 transducidas con shRNA control. (C) Tinción con H&E de una sección de este tumor. (D) Peso de los tumores extraídos de ratones NOD-SCID inoculados con células DG-75 portadoras de los shRNA indicados. Círculos, cuadrados y triángulos indican tumores individuales y las barras horizontales indican la media (barra larga) y SEM. Tratamiento estadístico, One-Way ANOVA con Bonferroni post-test; *** $P < 0.001$. (E) Análisis de la expresión de CDCA7 mediante inmunoblot en extractos de xenotransplantes control y silenciados.

Los datos mostrados indican que la expresión elevada de CDCA7 es necesaria para el mantenimiento del fenotipo maligno de la línea celular DG-75. Para comprobar que este

papel de CDCA7 no estaba restringido únicamente a esta línea celular, silenciamos su expresión en otras dos líneas celulares de BL: BL2 y Ramos. La transducción de estas células con los lentivirus portadores de los shRNA sh25 y sh83 redujo drásticamente la expresión de CDCA7 en relación a las células transducidas con el lentivirus control (Fig. 18A). Las células Ramos y BL2 en las que se produjo el silenciamiento de CDCA7 mostraron una capacidad muy reducida de formar colonias en agar blando (Fig. 18B y C). Paralelamente, el silenciamiento de CDCA7 en estas células también redujo su capacidad de formación de tumores al ser inoculadas en ratones inmunodeficientes NOD-SCID (Fig. 18D). Estos datos apoyan que la disminución de los niveles de expresión de la proteína CDCA7 en células de BL, reduce su capacidad de formación de tumores, sugiriendo que la expresión elevada de CDCA7 juega un papel fundamental en la linfomagénesis de al menos este tipo de linfoma.

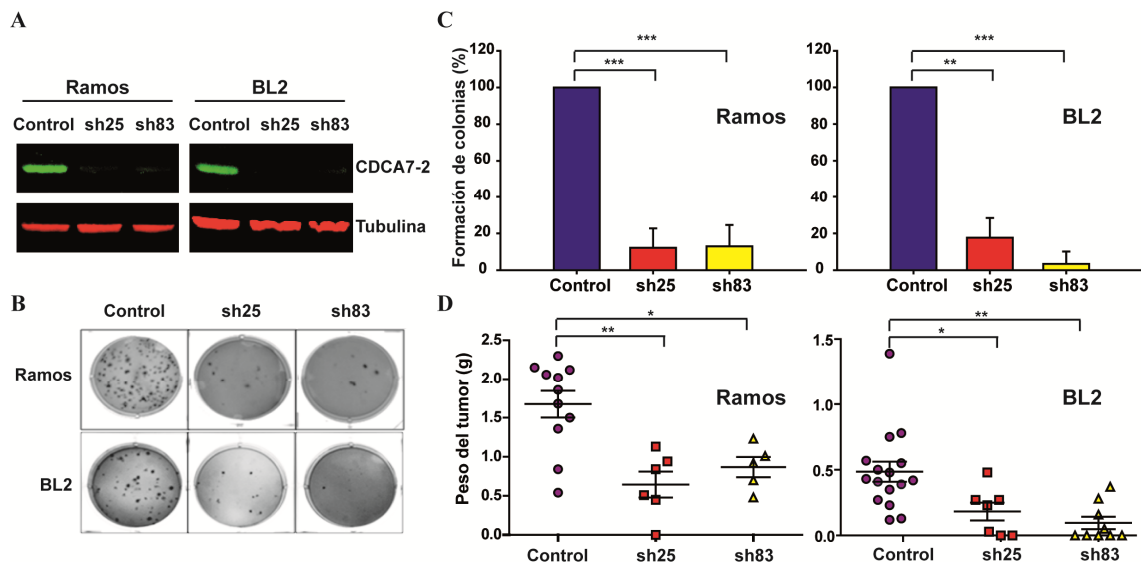


FIGURA 18. La reducción de la expresión de CDCA7 en células de BL Ramos y BL2 inhibe su capacidad de crecimiento independiente de anclaje y de formar tumores en ratones NOD-SCID. (A) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión de CDCA7 en células transducidas (Ramos y BL2) con los shRNAs control, sh25 y sh83. La expresión Tubulina se muestra como control. (B) Imágenes representativas de un ensayo de formación de colonias en agar blando mostrando pocillos con células Ramos y BL2 transducidas con los shRNA indicados. (C) La cuantificación del número de colonias formadas por Ramos (n=5) y BL2 (n=4) con CDCA7 silenciado con los shRNA indicados se muestra correlativa a sus correspondientes controles. (D) Peso de los tumores extraídos de ratones NOD-SCID inoculados con células Ramos y BL2 portadoras de los shRNA indicados. Círculos, cuadrados y triángulos indican tumores individuales y las barras horizontales indican la media (barra larga) y SEM. Tratamiento estadístico, One-Way ANOVA con Bonferroni post-test; *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

1.4. La reducción de la expresión de CDCA7 en líneas celulares de linfoma de Burkitt no afecta a su proliferación ni altera su progresión entre las distintas fases del ciclo celular.

CDCA7 es una proteína de función desconocida, por lo que existe la posibilidad de que su mediación del crecimiento dependiente de anclaje y de formación de tumores en ratones inmunodeficientes pudiera deberse a su capacidad de controlar el ciclo y la proliferación celular. Para descartar que la reducción de la capacidades tumorales observada en las células de sBL al disminuir los niveles de expresión de CDCA7 fuese debida a una pérdida de la viabilidad o de la proliferación celular en condiciones normales de cultivo, comparamos la capacidad de crecimiento y el ciclo celular de células DG-75, BL2 y Ramos con niveles de expresión de CDCA7 normales o reducidos.

La comparación del ciclo celular de éstas células realizado mediante análisis de la incorporación de yoduro de propidio no mostró diferencias significativas entre células control y silenciadas, dando en todos los casos un perfil de ciclo celular normal y dentro de los valores esperados (Fig. 19A). Del mismo modo, el análisis de proliferación celular mediante incorporación de EdU demuestra que el número de células proliferantes portadoras de shRNA de CDCA7 o bien del shRNA control apenas varía. (Fig. 19B). Estos datos apoyan que CDCA7 participa en procesos de la transformación tumoral maligna en un estadio posterior o al menos independiente a la consecución de la inmortalidad replicativa.

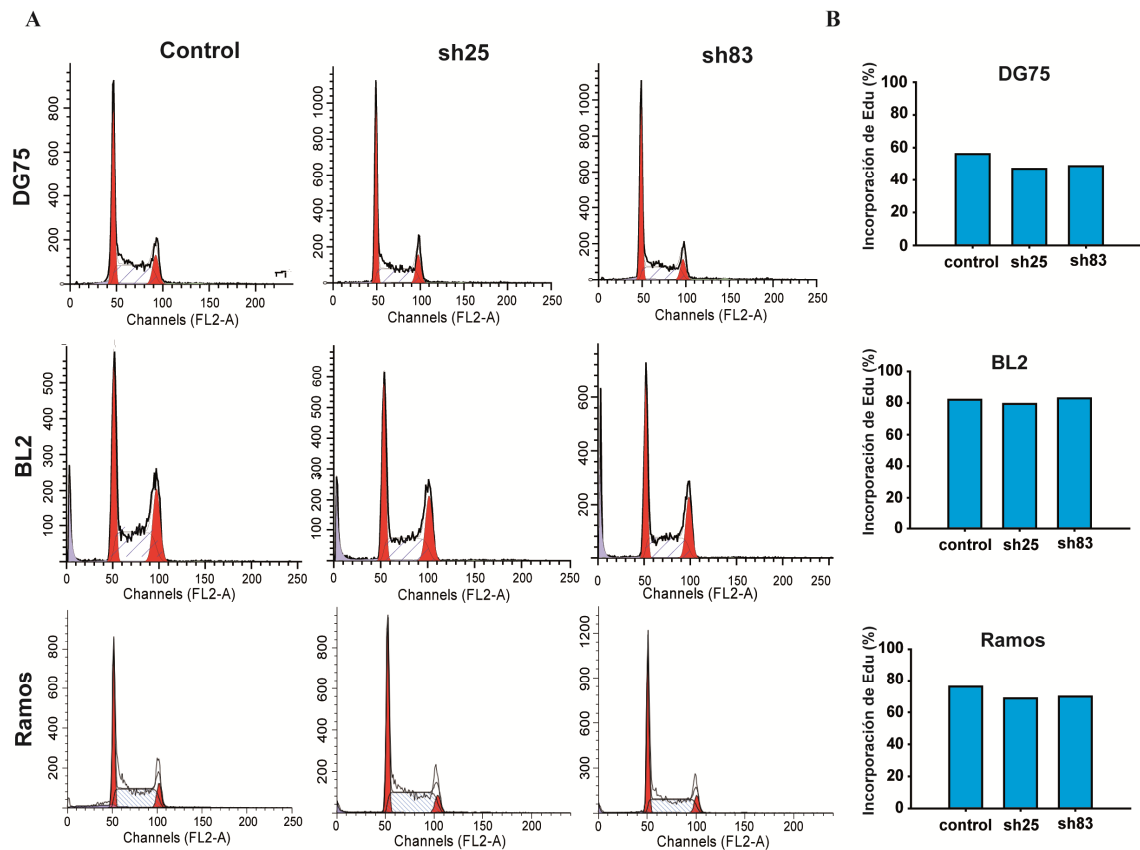


FIGURA 19. La inhibición de la expresión de CDCA7 en células de BL no afecta a su proliferación ni a su viabilidad en condiciones normales de cultivo. (A) Análisis representativo de ciclo celular mediante incorporación de yoduro de propidio en las líneas celulares indicadas, transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83. (B) Análisis representativo de la proliferación celular mediante incorporación de EdU en las células indicadas. Se muestra el porcentaje de células positivas tras un pulso de 24 h.

1.5. La expresión de *CDCA7* se encuentra elevada en líneas celulares de tumores de origen hematológico.

Para determinar si la presencia de niveles elevados de *CDCA7* puede ser un fenómeno común a otras neoplasias hematológicas y mediar su transformación maligna, analizamos su expresión en células derivadas de distintos tipos de tumores de origen hematológico. La expresión global de ARNm de *CDCA7* (determinada con una sonda común a las dos isoformas) y la expresión de cada una de las isoformas de *CDCA7* en líneas celulares de DLBCL era notablemente más elevada que en células solamente inmortalizadas (Fig. 20A). Además, al igual que ocurría con las células de BL, la expresión de la isoforma *CDCA7-2* era mucho más abundante que la de *CDCA7-1* (Fig. 20B).

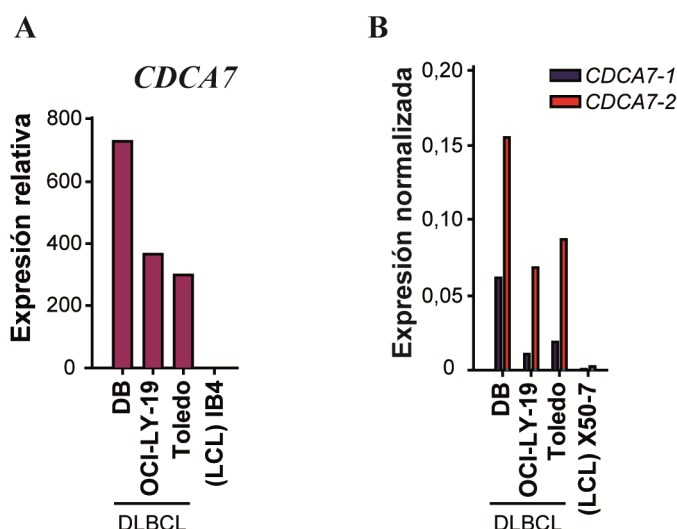


FIGURA 20. La expresión de CDCA7 es más elevada en líneas celulares de DLBCL que en las de LCL. (A) Análisis de la expresión de CDCA7 mediante RTq-PCR en las líneas celulares indicadas normalizada para la expresión de β -Actina. Se muestra la expresión relativa a la de la línea celular IB4. **(B)** Análisis de los niveles de expresión de cada una de las isoformas de CDCA7 en las líneas celulares indicadas mediante RTq-PCR (datos normalizados con β -Actina).

Del mismo modo, el análisis inmunohistoquímico de los niveles de proteína CDCA7 también eran más elevados en biopsias de pacientes de DLBCL que en los tejidos control (Fig. 21). Los resultados obtenidos confirmaron que la expresión de CDCA7 se encontraba elevada en los 4 casos de DLBCL analizados con respecto a centros germinales de amígdalas reactivas (Fig. 21).

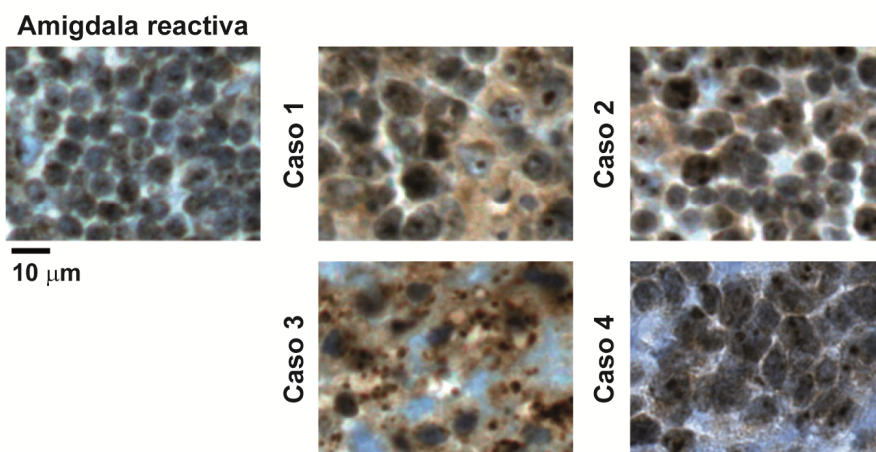


FIGURA 21. La expresión de CDCA7 es más elevada biopsias de DLBCL que en tejido control. Imágenes representativas de la expresión de CDCA7 en secciones de los casos indicados de DLBCL y de una sección del centro germinal de una amígdala reactiva.

Para confirmar que la desregulación de la expresión de CDCA7 en líneas celulares de DLBCL no afectaba solo a su ARNm, sino también a su proteína, comparamos mediante inmunoblot sus niveles con los de células solamente immortalizadas (LCL) y células de BL. Nuestros resultados mostraron que CDCA7-2 es notablemente más abundante en las células de DLBCL Toledo, DB, OCI-LY-19 y Karpas-422 que en las células inmortales X50-7 (Fig. 22A). Su expresión era similar a la de las células de BL Ramos y a la de las células de otro tipo de linfoma B, el linfoma folicular (FL) Wsu-NHL (Fig. 22A).

Como la línea de FL presentaba niveles elevados de CDCA7 decidimos determinar el estatus de CDCA7 en otra línea de FL (RS11846) y en otros tipos de neoplasias de linfocitos B, incluyendo 2 líneas de linfoma de células del manto (Z138 y Granta 519), 2 líneas clasificadas como de linfoma no-Hodgkin (RL y SUDHL.4) y la línea de leucemia linfocítica aguda B (ALL-B) 380. En este caso, todas las líneas de linfoma y la línea de leucemia presentaban niveles de expresión similares a los de las células de BL DG-75 y superiores a los de las células inmortales X50-7 (Fig. 22B). Siguiendo el mismo tipo de razonamiento que en el caso anterior, y debido a que la línea de leucemia B presentaba niveles de expresión de CDCA7 similares a los de DG-75, decidimos determinar sus niveles en células de diferentes tipos de leucemias. Observamos que CDCA7 estaba sobre expresado en las líneas de leucemia linfocítica aguda T (ALL-T) Jurkat y Molt-4 con relación a las células inmortales JC5 (Fig. 22C). Sin embargo, las líneas de leucemia mieloide U937 y K562 presentaban niveles de expresión inferiores a DG-75 (BL) aunque superiores a los de la LCL JC5 (Fig. 22C). Tan sólo la línea Hel presentaba niveles de expresión similares a las células inmortales JC5 (Fig. 22C).

Finalmente decidimos analizar la expresión de CDCA7 en una serie de líneas celulares derivadas de tumores de origen no hematológico y observamos que sus niveles en células de carcinoma embrionario de riñón HEK-293T, de carcinoma de colon HCT-16 y de osteosarcoma U2OS eran más elevados que en linfocitos B inmortalizados X50-7, mientras que su expresión no era tan elevada en células de osteosarcoma Saos-2 o de carcinoma de cérvix HeLa (Fig. 22D). Aunque estos resultados podrían sugerir que CDCA7 también estaría sobre expresado en neoplasias no hematológicas, sería necesario comparar su expresión con células normales o inmortales del mismo origen para confirmarlo.

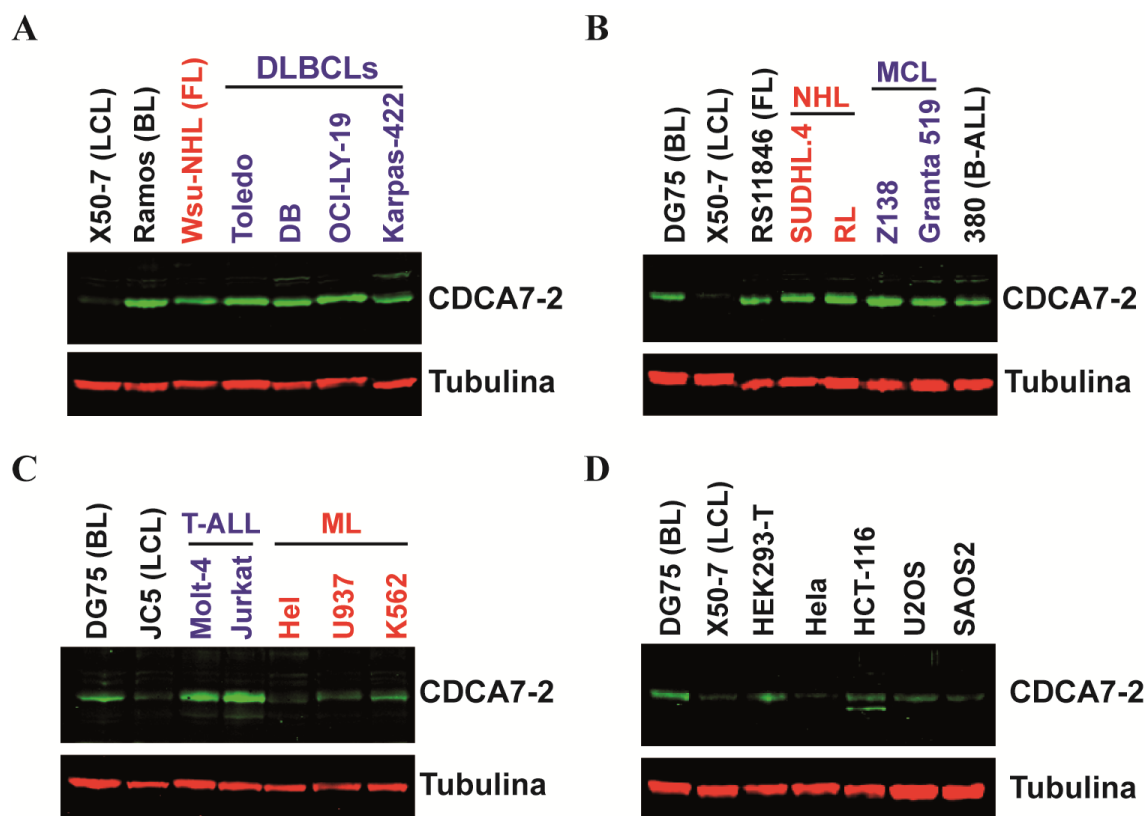


FIGURA 22. La expresión de CDCA7 se encuentra elevada en células de diversos tipos de neoplasias. Immunoblots representativos de la expresión de CDCA7 en (A) las líneas celulares de DLBCL Toledo, DB, OCI-LY-19 y Karpas 422 y de FL Wsu-NHL; (B) líneas celulares de FL (RS11846) de MCL (Z138 y Granta 519) de NHL (SUDHL.4 y RL) y de ALL-B (380); (C) líneas celulares derivadas de leucemias T (Molt-4 y Jurkat) y leucemias mieloides (Hel, U937 y K562) ; y (D) líneas celulares de carcinoma embrionario de riñón (HEK-293T), carcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma de colon (HCT-116) y osteosarcoma (U2OS y Saos-2). Células inmortales LCL (X50-7 y JC5) y células de BL (Ramos y DG-75) fueron empleadas como referencia. La expresión de Tubulina se empleó como control de carga.

1.6. La reducción de la expresión de CDCA7 en Linfoma Difuso y Leucemia T reduce su capacidad de formar tumores.

Para determinar si la presencia de niveles elevados de CDCA7 puede mediar la transformación maligna no solo en BL, sino también en otros tipos de neoplasias linfoides, analizamos el efecto de su silenciamiento en células derivadas de otros tipos de tumores de origen hematológico. Seleccionamos como ejemplos las células de DLBCL Toledo y de ALL-T Molt-4. Además de expresar niveles elevados de CDCA7-2 (Fig. 23A) ambas líneas también expresaban niveles detectables de CDCA7-1 (Fig. 23A). La transducción con lentivirus portadores de shRNA específicos de CDCA7 (sh25 o sh83) disminuía drásticamente la expresión de ambas isoformas de CDCA7 en los dos tipos celulares (Fig. 23A). La inoculación subcutánea de células Toledo o Molt-4 transducidas con lentivirus sh-control en ratones inmunodeficientes NOD-SCID dio lugar a la

formación de tumores en los sitios de inoculación (Fig. 23B). El silenciamiento de CDCA7 en estas células provocó una significativa reducción del tamaño de los tumores o incluso previno su formación en el periodo de 3 semanas estudiado (Fig. 23B).

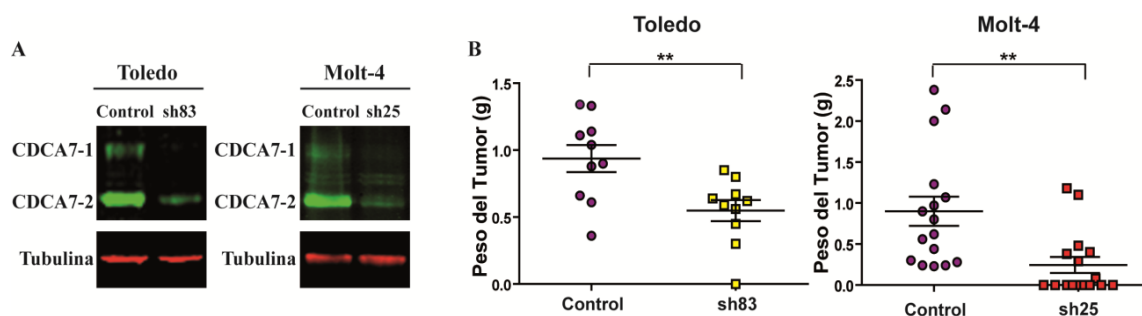


FIGURA 23. La expresión elevada de CDCA7 en las líneas celulares Toledo (DLBCL) y Molt-4 (Leucemia T) media la formación de tumores en ratones inmunodeficientes. (A) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión de CDCA7 en células Toledo y Molt-4 transducidas con los shRNAs control, sh25 y sh83 y seleccionadas en presencia de puromicina durante 5-6 días. La expresión de Tubulina se muestra como control. (B) Peso de los tumores extraídos de ratones NOD-SCID 3 semanas después de su inoculación con células Toledo y Molt-4 portadoras de los shRNA indicados. Círculos y cuadrados indican tumores individuales y las barras horizontales indican la media (barra larga) \pm SEM. Tratamiento estadístico, t de Student pareado; **P<0.01.

1.7. La expresión elevada de CDCA7 no es necesaria para el crecimiento independiente de anclaje de la neoplasia no linfóide HEK293-T.

Mientras que nuestros resultados sugieren que CDCA7 es un mediador esencial de la transformación tumoral en neoplasias linfoides, otros grupos habían descrito previamente que CDCA7 es un pobre mediador de transformación tumoral de células de origen fibroblástico (Prescott *et al.*, 2001; Osthus *et al.*, 2005). Esto nos llevó a analizar el efecto del silenciamiento de CDCA7 sobre el fenotipo de transformación maligna en células tumorales de origen no hematopoyético que expresaran niveles de CDCA7 similares a los de las neoplasias linfoides. Para ello seleccionamos las células de carcinoma embrionario de riñón HEK-293T. Estas células fueron lentiviralmente transducidas con shRNA control y los shRNA de CDCA7 sh25 y sh83 y seleccionadas con puromicina durante 5-6 días. El análisis de la expresión de CDCA7 en las células transducidas mostraba un silenciamiento muy eficiente por sh25 y sh83 (Fig. 24A). Comprobamos, entonces, la capacidad de las células control y con CDCA7 silenciado para crecer con independencia de su anclaje a un sustrato sólido y observamos que la reducción de la expresión de CDCA7 apenas afectaba la formación de colonias en agar blando (Fig. 24B y 24C). Al igual que ocurría con las células linfoides, el silenciamiento de CDCA7 no afectaba el

ciclo celular ni la proliferación de las células en condiciones normales de cultivo (Fig. 24D y 24E).

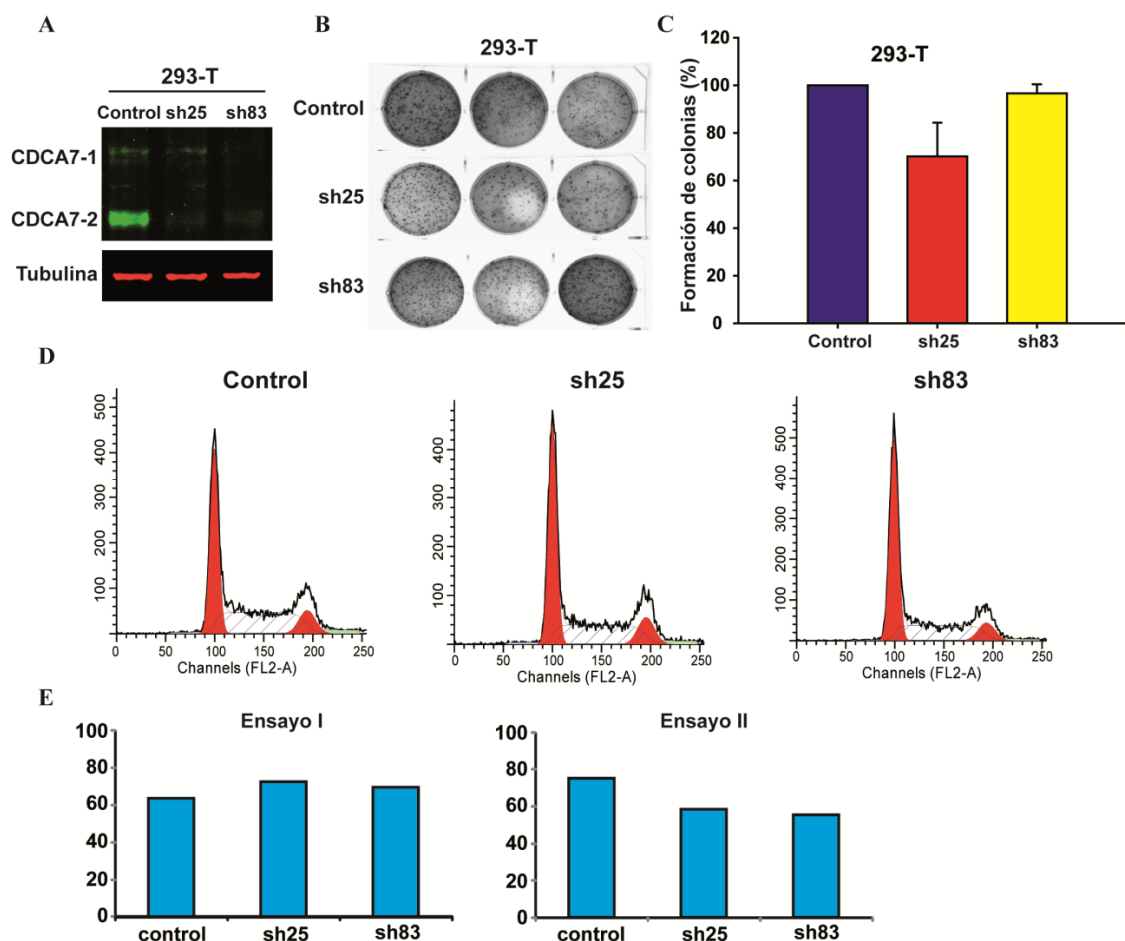


FIGURA 24. La inhibición de la expresión de CDCA7 en células HEK293-T apenas afecta a su crecimiento independiente de anclaje. (A) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión de CDCA7 en células HEK-293T transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83 y seleccionadas en presencia de puromicina durante 5-6 días. La expresión de Tubulina se muestra como control. (B) Imágenes representativas de un ensayo de crecimiento en agar blando donde se muestran los pocillos en triplicado con células HEK293-T transducidas con los shRNA indicados. (C) Cuantificación relativa del número de colonias formadas por éstas células (n=4) en relación a su control (medias+SEM). (D) Estudio representativo de ciclo celular mediante análisis por citometría de flujo de la incorporación de yoduro de propidio en células HEK-293T transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83. (E) Estudio de la proliferación celular mediante análisis por citometría de flujo de la incorporación de EdU en estas células. Se muestra el porcentaje de células positivas tras un pulso de 24h en dos experimentos independientes.

1.8. El silenciamiento de la expresión de CDCA7 en fibroblastos primarios de piel humana S1F no altera su perfil de ciclo celular.

En conjunto, nuestros datos indican que CDCA7 desempeña un papel fundamental en la transformación tumoral de neoplasias linfoides y apoyan los datos previamente publicados mostrando un papel más bien discreto de esta proteína en la transformación tumoral de células no linfoides. Estos datos sugieren que el desarrollo de terapias basadas en el silenciamiento de CDCA7 podrían ser efectivas en el tratamiento de neoplasias

linfoides. Dado que la mayor parte de los efectos secundarios de las terapias antitumorales se deben a sus efectos sobre células normales de los pacientes, analizamos la expresión de CDCA7 en fibroblastos humanos primarios y el efecto de su silenciamiento sobre su ciclo celular. La expresión de proteína CDCA7 en fibroblastos primarios de piel humana (S1F) fue indetectable (Fig. 25A) incluso forzando la exposición del inmunoblot (no mostrado). En cambio, la expresión de ARNm de *CDCA7* en estas células pudo detectarse mediante qPCR (Fig. 25B). La transducción lentiviral de estas células con shRNA control, sh25 y sh83 indicaba que los shRNA específicos de *CDCA7* inhibían la expresión de su ARNm (Fig. 25B). Estos fibroblastos muestran un crecimiento muy lento, por lo que la mayor parte de las células en cultivos asíncronos se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular (Fig. 25C) y el silenciamiento de *CDCA7* en estas células no causó ninguna alteración del ciclo celular ni la aparición de una población sub-G0/G1 que pudiera indicar inducción de apoptosis (Fig. 25C). Dado que nuestros resultados indican que el silenciamiento de *CDCA7* no afecta al ciclo celular ni a la proliferación dependiente de anclaje tanto de células tumorales como la de fibroblastos primarios, proponemos que el silenciamiento o la inactivación de *CDCA7* podría servir como diana terapéutica para el tratamiento de neoplasias linfoides sin apenas presentar efectos severos en poblaciones celulares normales.

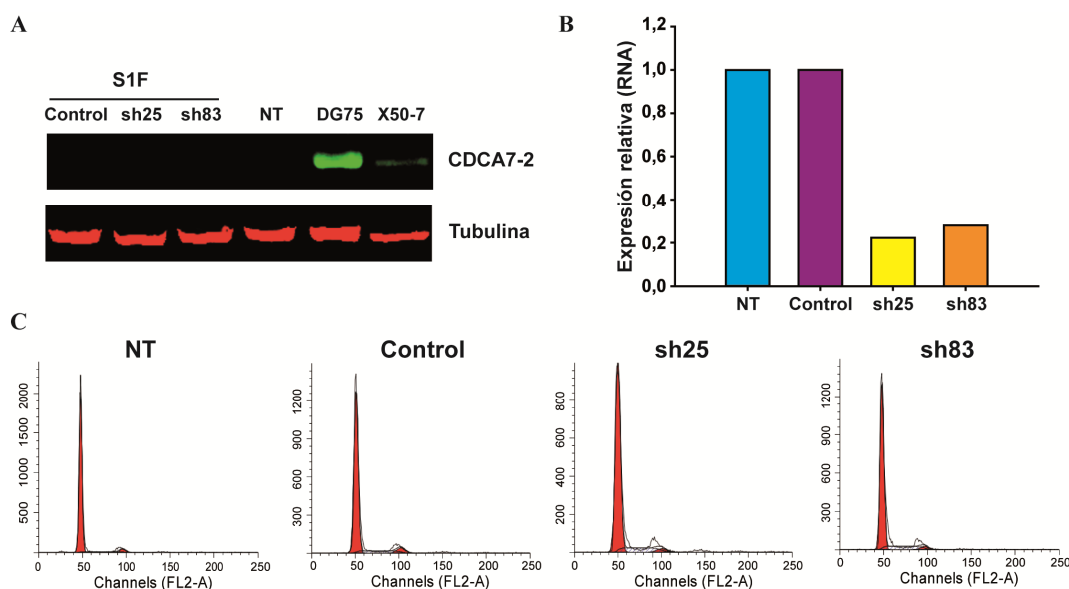


FIGURA 25. La expresión de CDCA7 en fibroblastos primarios de piel humana (S1F) es indetectable por inmunoblot y su silenciamiento no altera su ciclo celular. (A) Análisis de la expresión de CDCA7 y Tubulina mediante inmunoblot en células S1F no transducidas (NT) o transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83. (B) Análisis de la reducción de los niveles de expresión de ARNm de *CDCA7* en estas mismas células mediante RTq-PCR. Los datos fueron normalizados para la expresión de β -Actina y se muestran relativos a las células no transducidas (NT). (C) Estudio de ciclo celular mediante análisis por citometría de flujo de la incorporación de yoduro de propidio de las células S1F no transducidas (NT) en comparación con las transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83.

1.9. La reducción de los niveles de CDCA7 no afecta a la muerte celular en condiciones de privación de suero o en respuesta a tratamientos con drogas quimioterapéuticas.

Debido a que el crecimiento autónomo/autosuficiente es una característica de las células tumorales, determinamos si la reducción de los niveles de CDCA7 podría contribuir a una sensibilización hacia la muerte celular inducida por privación de suero. Para ello, cuantificamos la respuesta de células de la línea de DG-75 transducidas con los distintos lentivirus portadores de los shRNA control, sh25 y sh83 a diferentes condiciones limitantes de suero (0%, 0.1%, 0.5%, 2%, 5% y 10%) y determinamos la viabilidad celular mediante incorporación de yoduro de propidio tras 24h, 48h y 72h. Los resultados obtenidos apuntan a que CDCA7 no media la resistencia de estas células a la privación de factores de crecimiento (Fig. 26).

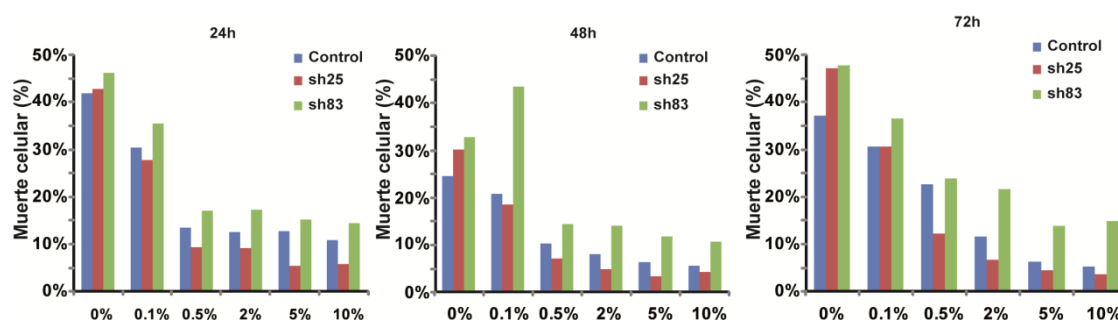


FIGURA 26. La inhibición de la expresión de CDCA7 no induce una sensibilización a la muerte celular en condiciones limitantes de factores de crecimiento. Estudio representativo de la muerte celular mediante análisis de la incorporación de yoduro de propidio en las líneas celulares indicadas, en condiciones limitantes de suero (0%, 0.1%, 0.5%, 2%, 5%, y 10%) analizadas a 24h, 48h, y 72h. Se muestra el % de células positivas.

Una de las características frecuentes en la progresión tumoral maligna, y a la que se le atribuyen la mayoría de los fracasos farmacológicos, es la resistencia a drogas quimioterapéuticas. Debido a esto nos preguntamos si CDCA7 podría estar implicado en alguna ruta de resistencia. Para ello, se analizó la muerte celular, medida como incremento de la población sub G0, en respuesta a diferentes concentraciones de las drogas quimioterapéuticas Bleomicina y Cis-platino. Los resultados obtenidos apuntan a que la disminución de los niveles de CDCA7 en células de linfoma DG-75 no las sensibiliza de forma significativa a la muerte celular inducida por estas drogas (Fig. 27A y B).

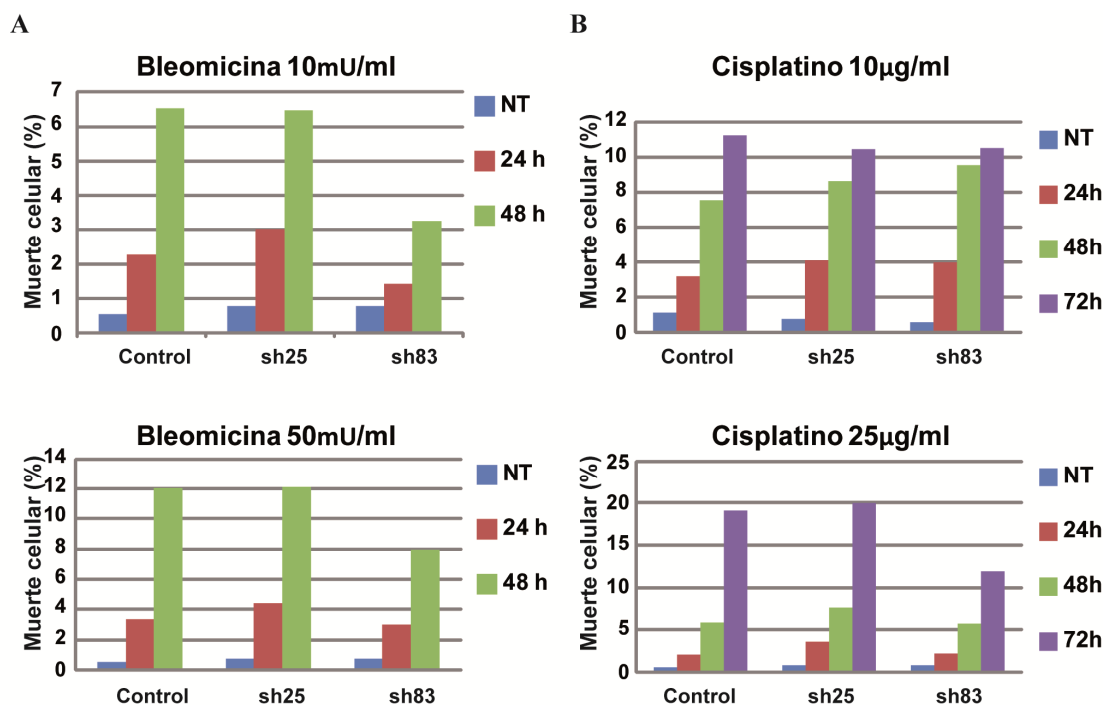


FIGURA 27. La inhibición de la expresión de CDCA7 no induce una sensibilización a la muerte celular en respuesta a tratamientos quimioterapéuticos. Análisis representativo mediante citometría de flujo del % de población sub G0 para las células iniciadas en respuesta a (A) tratamiento con 10mU/ml o 50mU/ml de bleomicina durante 0h, 24h y 48h o (B) en respuesta a tratamiento con 10 µg/ml o 25 µg/ml de Cisplatino durante 0h, 24h, 48h, y 72h.

2. LA EXPRESION ELEVADA DE CDCA7 OTORGA A LAS CÉLULAS TUMORALES PROPIEDADES MIGRATORIAS E INVASIVAS.

Aunque el silenciamiento de CDCA7 inhibe notablemente el crecimiento de las neoplasias linfoides en nuestro modelo de xenotransplante, las células silenciadas retienen cierta capacidad de formación de tumores. El análisis histológico de los tumores formados por células control y células silenciadas reveló diferencias notables en la estructura tisular. Mientras que los tumores formados por las células control parecían invadir y disgregar los tejidos musculares y adiposos adyacentes, en los formados por células silenciadas la organización de los tejidos adyacentes apenas se encontraba afectada (Fig. 28). Estos datos sugieren que la inhibición de la expresión de CDCA7 podría disminuir la capacidad invasiva de las neoplasias linfoides.

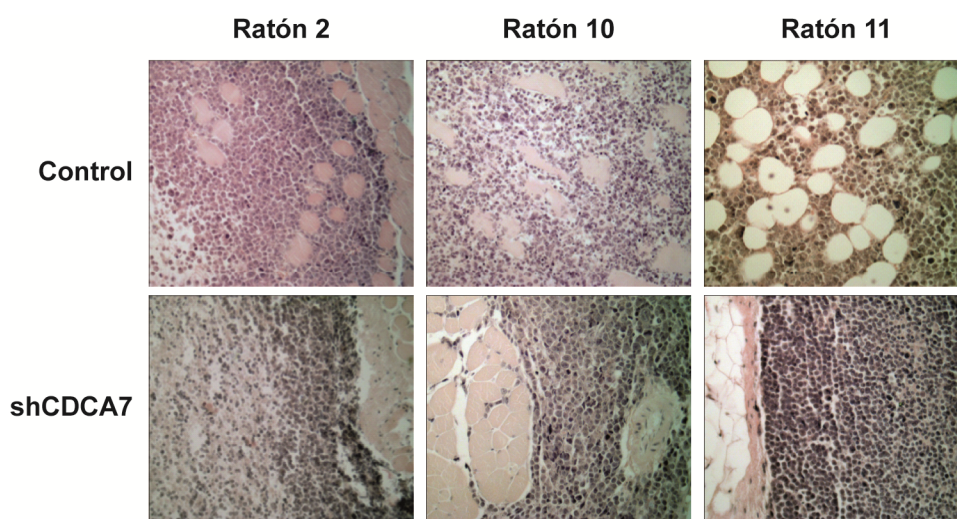


FIGURA 28. El silenciamiento de CDCA7 disminuye la capacidad invasiva *in vivo*. Células DG-75 transducidas con shRNA control o los shRNA específicos para CDCA7 sh25 o sh83 (shCDCA7) fueron inoculadas en flancos opuestos de un mismo ratón. Los tumores formados fueron extraídos al cabo de 3 semanas. Se muestran imágenes representativas de secciones histológicas de estos tumores respetando (paneles inferiores) o no (paneles superiores) la organización de los tejidos musculares (paneles izquierdo y central) y adiposos (paneles derecha) adyacentes. Células con sh25, paneles inferiores izquierdo y derecho; células con sh83, panel inferior central. Barra, 50 μ m.

2.1. El silenciamiento de CDCA7 reduce significativamente la invasión *in vivo* en el modelo de pez cebra.

Dado que la adquisición de propiedades invasivas/metastásicas tiene una fuerte influencia negativa en el pronóstico de los pacientes con cáncer, nos propusimos confirmar el papel de CDCA7 en la capacidad invasiva de las células tumorales. Para ello, utilizamos un modelo de invasión *in vivo* en pez cebra. En este modelo, las células estudiadas son teñidas e inoculadas en el saco vitelino de larvas de este pez. Las células

con capacidad invasiva son capaces de migrar desde el saco vitelino hacia regiones caudales, donde pueden visualizarse gracias a la tinción previa (Fig. 29A). Células DG-75 fueron transducidas con shRNA control o específicos de CDCA7 (sh25, sh40 y sh83) y la eficiencia del silenciamiento fue verificada mediante inmunoblot (Fig. 29B). Las células transducidas fueron teñidas e inoculadas en el saco vitelino de larvas de pez cebra y se cuantificó el número de larvas en las que se había producido invasión. Los resultados obtenidos indicaban que el silenciamiento de CDCA7 con cualquiera de los shRNAs específicos empleados reducía notablemente el número de embriones en los que se detectaba invasión (Fig. 29C). Por lo tanto, estos datos apoyan que CDCA7 es un mediador fundamental de la capacidad invasiva de las células tumorales.

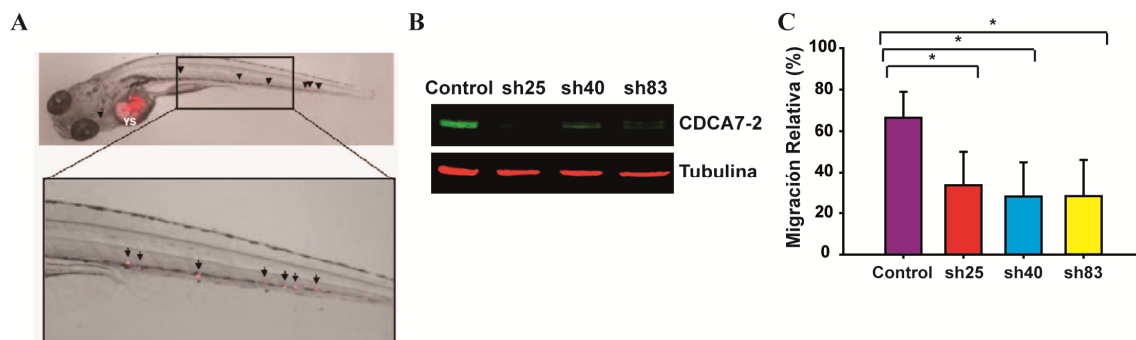


FIGURA 29. El silenciamiento de CDCA7 reduce las propiedades invasivas de las células tumorales DG-75. (A) Foto representativa de una larva de pez cebra en la que se ha producido invasión (se detectan ≥ 5 células teñidas en la región caudal). (B) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión de CDCA7 en células DG-75 transducidas con los shRNA control, sh25, sh40 y sh83. (C) Células DG-75 transducidas con los shRNA indicados fueron teñidas e inoculadas en larvas de pez cebra (100-150 células/larva en 30-50 larvas por cada experimento) y el porcentaje de larvas positivas para invasión fue determinado. Se muestran las medias \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$. Tratamiento estadístico, t de Student pareado.

2.2. La expresión elevada de CDCA7 en la línea celular DG-75 es necesaria tanto para la motilidad celular como para la migración dirigida hacia un estímulo quimiotáctico.

La capacidad invasiva de las células está relacionada, al menos en parte, con su capacidad de migración hacia estímulos quimiotácticos. Para comprobar si el silenciamiento de CDCA7 afectaba la capacidad migratoria de las células, sembramos células DG-75 transducidas con lentivirus control o silenciadores de CDCA7 (sh25) en cámaras de Transwell recubiertas con fibronectina y determinamos su capacidad de migración tras 4 y 24h hacia medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero como estímulo quimiotáctico. La tinción de las membranas de los Transwell mostraba

una notable inhibición de la migración quimiotáctica al silenciar la expresión de CDCA7 (Fig. 30A). La contabilización de las células que habían conseguido atravesar la membrana y accedieron a la cámara inferior mostraba una reducción del 50% en la capacidad migratoria de las células con expresión reducida de CDCA7 (Fig 31B).

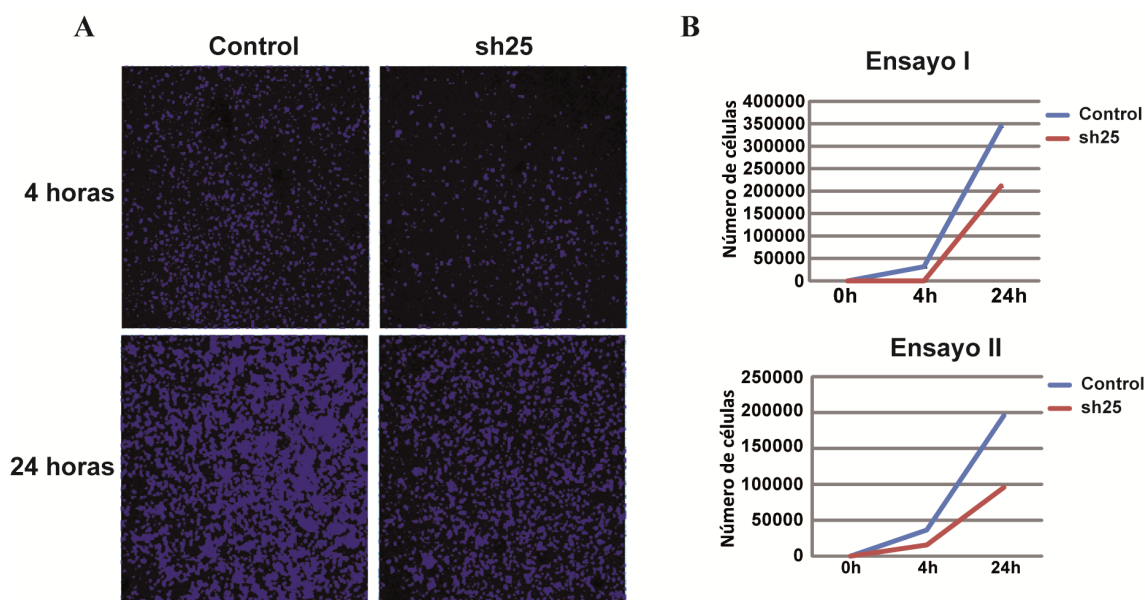
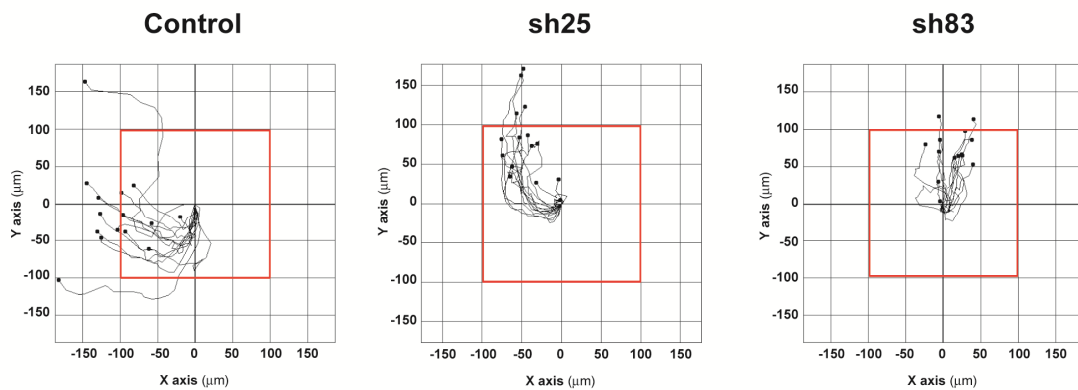


FIGURA 30. El silenciamiento de CDCA7 reduce la capacidad de migración *in vitro*. (A) Células DG-75 transducidas con shRNA Control o específico de CDCA7 (sh25) fueron sembradas en la cámara superior de Transwell con membranas recubiertas con 25 μ g/ml de fibronectina (10^5 células/pocillo en medio RPMI). La cámara inferior contenía RPMI suplementado con 10% FBS como estímulo quimiotáctico. Imágenes representativas de la tinción con DAPI de la membrana del transwell a los tiempos indicados. (B) Cuantificación del número de células capaces de atravesar la membrana y acceder a la cámara inferior. Se muestra la media de réplicas experimentales en dos ensayos independientes.

El efecto del silenciamiento de CDCA7 en quimiotaxis podría ser debido a una menor respuesta de las células silenciadas al estímulo quimiotáctico y/o a una menor motilidad de estas células. Para determinar si CDCA7 desempeña un papel importante en la regulación de la motilidad celular llevamos a cabo un seguimiento de las células DG-75 control o silenciadas (sh25 y sh83) sembradas sobre cámaras μ -Slide recubiertas con fibronectina. El movimiento de estas células fue registrado durante 4h tomando fotografías cada 2 minutos con un equipo Cell Observer. El análisis de las trayectorias de células individuales mostraba que las células silenciadas recorrieron distancias más cortas (Fig. 31A) que las células control. En concreto, 8 de las 15 trayectorias analizadas de células control excedieron los límites del recuadro indicado, mientras que sólo 4 o sólo 2 de las 15 trayectorias analizadas de células silenciadas con los shRNA sh25 o sh83

(respectivamente) excedieron los límites del recuadro (Fig. 31A). El análisis de la velocidad de desplazamiento de estas células sugiere que podría ser inhibida a causa del silenciamiento de CDCA7 (Fig. 31B).

A



B

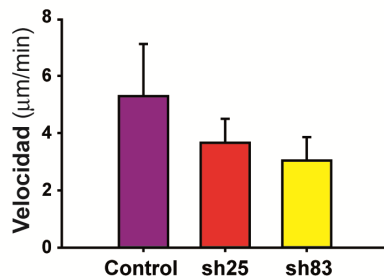


FIGURA 31. El silenciamiento de CDCA7 inhibe la motilidad celular. (A) Diagramas representativos de las trayectorias de 15 células DG-75 individuales transducidas con los shRNA control, sh25 y sh83. El recuadro rojo fue colocado arbitrariamente como referencia. (B) Cuantificación de la velocidad de desplazamiento de estas mismas células.

Es de destacar que un gran número de células control salieron del campo visual registrado y fueron descartadas para estos dos tipos de análisis (datos no mostrados), lo que sugiere que el efecto producido por el silenciamiento de CDCA7 podría ser mayor que el cuantificado en este experimento. Además, como pudimos comprobar por inmunofluorescencia (Fig. 32), existe gran heterogeneidad de expresión de CDCA7 dentro de la misma población control, lo cual sugiere que podríamos estar ante la misma heterogeneidad de comportamientos migratorios.

2.3. CDCA7 se comporta como un modulador del citoesqueleto de actina afectando al grado de nucleación de la actina y a la extensión celular.

La migración celular es un fenómeno complejo que requiere procesos de extensión y contracción celular y ciclos de formación y destrucción de adhesiones focales (Stossel, 1994). Para caracterizar el mecanismo por el que CDCA7 media la motilidad y migración de las células de linfoma decidimos analizar el efecto del silenciamiento de CDCA7 sobre los procesos de extensión celular y de polimerización de actina. Observamos que tanto la extensión celular como la polimerización de actina aumentaban notablemente al reducir la expresión de CDCA7 en la línea celular DG-75 (Fig. 32). Es de destacar que en las células de la población transducida con shRNA control que mostraban una baja expresión de CDCA7 también se observaba un mayor nivel de extensión celular y de polimerización de actina (Fig. 32).

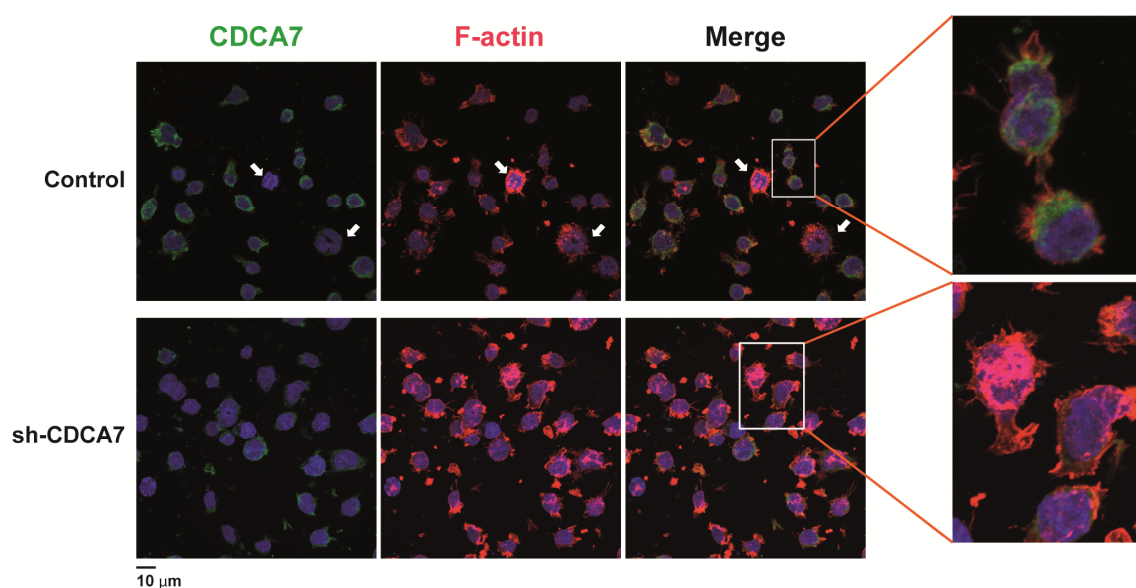


FIGURA 32. El silenciamiento de CDCA7 aumenta la polimerización de actina y la extensión celular en las células de linfoma DG-75. Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando el efecto de la disminución de CDCA7 (verde) sobre la extensión celular y el citoesqueleto de actina (Faloidina en rojo) en células DG-75 transducidas con los shRNA control y sh83. Con flechas blancas se ilustra como una menor presencia de CDCA7 correlaciona con un mayor grado de polimerización de actina en la población control.

Para descartar que este efecto en polimerización de actina y extensión celular fuesen una particularidad de la línea DG-75. Analizamos el efecto del silenciamiento en la línea celular BL2 observando que al igual que ocurría con la línea DG-75, el silenciamiento de CDCA7 se veía acompañado de un incremento de la extensión celular y un mayor grado

de nucleación de la actina (Fig. 33). Aunque los resultados obtenidos en BL2 no muestran unas diferencias tan espectaculares como en DG-75, la monitorización de la faloidina a través del canal gamma high nos permitió comprobar que en esta línea celular se reproducían de forma análoga los efectos observados para DG-75. Estos datos sugieren que la expresión elevada de CDCA7 en células de linfoma inhibe la polimerización de actina y el proceso de extensión celular.

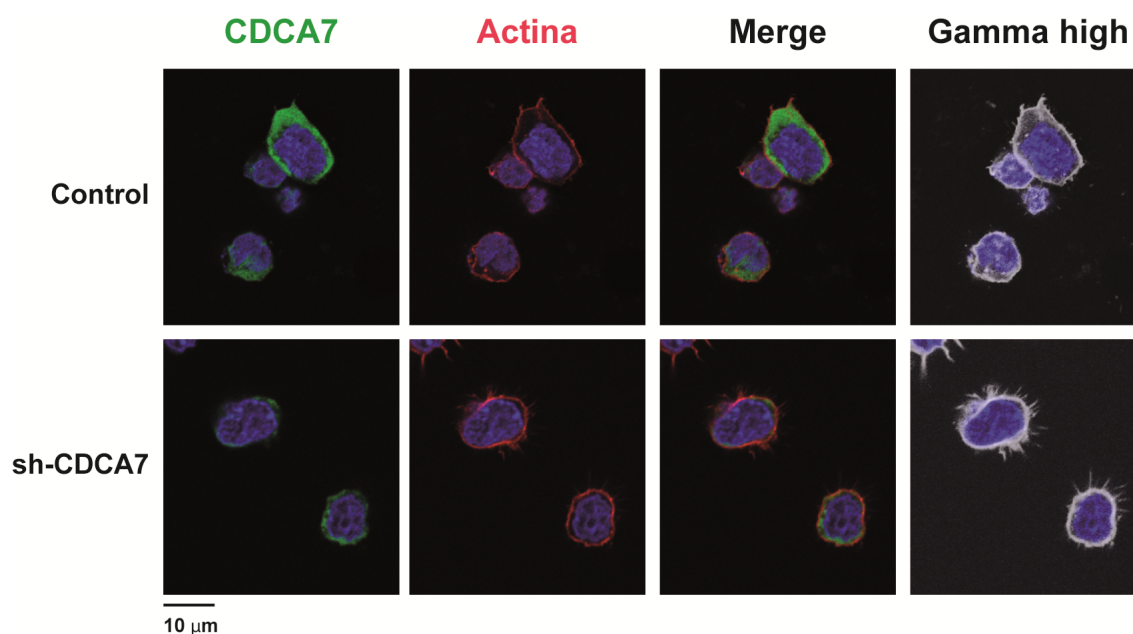


FIGURA 33. El silenciamiento de CDCA7 aumenta la polimerización de actina y la extensión celular en las células de linfoma BL2. Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando el efecto de la disminución de CDCA7 (verde) sobre la extensión celular y el citoesqueleto de actina (Faloidina en rojo) en células BL2 transducidas con los shRNA control y sh25. En el panel de la derecha se muestra la señal de la faloidina a través del canal gamma high para mayor apreciación de las estructuras.

2.4. La inmunoprecipitación de CDCA7 desvela presuntos interactores relacionados con el citoesqueleto de actina.

Dado que hay muy pocos estudios publicados de la función y las características de CDCA7, no se conoce casi nada de los mecanismos moleculares en los que podría participar. Para empezar a estudiar estos mecanismos, decidimos caracterizar su interactoma. Se obtuvieron para ello extractos de proteínas de células de linfoma DG-75 y se inmunoprecipitaron con nuestro anticuerpo policlonal anti-CDCA7 (S99) o con su correspondiente suero pre-inmune (PI). Una pequeña parte de las proteínas inmunoprecipitadas (10%) fue analizada mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-

CDCA7 S99 y un secundario anti-inmunoglobulina de conejo conjugado a peroxidasa que reconoce preferentemente, pero no exclusivamente, la inmunoglobulina no desnaturalizada. Aunque la eficiencia de la inmunoprecipitación fue muy discreta, en estas condiciones fue posible detectar la presencia de CDCA7 en los extractos inmunoprecipitados específicamente (Fig. 34).

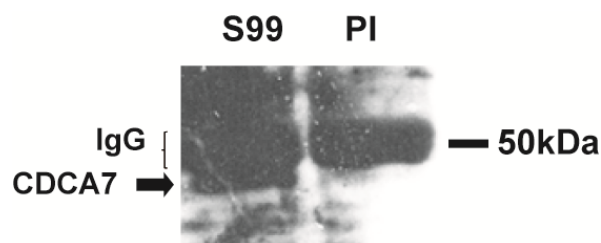


FIGURA 34. Inmunoprecipitación de CDCA7 en extractos proteicos de células DG-75. Extractos proteicos de células de linfoma DG-75 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-CDCA7 S99 o con su correspondiente suero pre-inmune (PI). Las proteínas inmunoprecipitadas fueron fraccionadas en un gel del 8% de SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana fue hibridada con el anticuerpo anti-CDCA7 S99 y un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo que reconoce preferentemente las inmunoglobulinas no desnaturalizadas.

El resto de las proteínas inmunoprecipitadas (90%) fueron fraccionadas en geles de SDS-poliacrilamida del 8% y del 12% para lograr una mejor definición de las proteínas de alto o de bajo peso molecular. La tinción con plata de estos geles reveló la presencia de numerosas bandas inmunoprecipitadas más eficientemente por el suero S99 que por el control (Fig. 35). Las proteínas presentes en la mayoría de estas bandas fueron identificadas posteriormente mediante espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología.

La presencia de proteínas de ≈ 50 kDa era muy abundante en ambos geles y, aunque pensábamos que probablemente correspondería a la cadena pesada de las inmunoglobulinas empleadas en la inmunoprecipitación, decidimos analizar varios fragmentos de gel correspondientes a esta región para ver si podíamos identificar péptidos de CDCA7. Desafortunadamente, CDCA7 no fue encontrado en ninguno de estos fragmentos, mientras que la presencia de inmunoglobulina de conejo fue muy abundante en todas. Parece probable, por lo tanto, que la escasa abundancia de CDCA7 en comparación con la de la cadena pesada de las inmunoglobulinas haya impedido su detección.

Es de destacar que la mayoría de las proteínas co-inmunoprecipitadas por el anticuerpo anti-CDCA7 están relacionadas con el citoesqueleto de actina-miosina, destacando las cadenas ligeras y pesadas de MIOSINA (MYL6, MYL12A, MYL12B, y MYH9), ACTINA G1, ACTINA B, ARP2, ARPC4, TPM2, TPM3 y CAPZ1. Estos datos podrían proporcionar un nexo para explicar los resultados observados por el silenciamiento de CDCA7 en extensión celular, migración, invasión e incluso crecimiento independiente de anclaje.

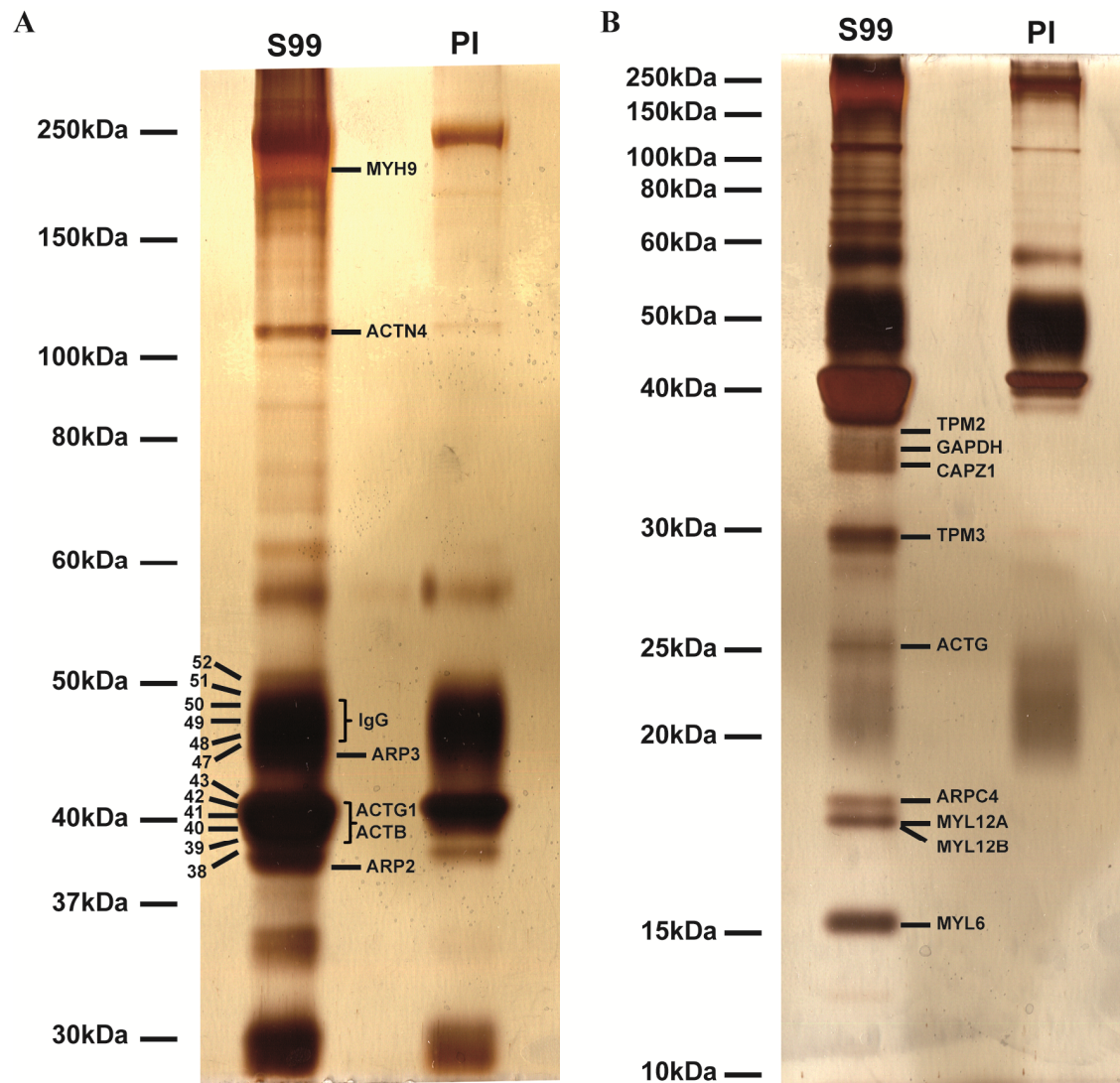


FIGURA 35. CDCA7 se asocia preferentemente con proteínas del citoesqueleto celular de ACTINA Y MIOSINA. Extractos proteicos de células de linfoma DG-75 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-CDCA7 S99 o con su correspondiente suero pre-inmune (PI). Las proteínas inmunoprecipitadas fueron fraccionadas en geles de SDS-poliacrilamida del 8% (A) o del 12% (B). Se muestra una imagen de estos geles tras su tinción con plata indicando los símbolos de las proteínas presentes en algunas de las bandas detectadas e identificadas mediante espectrometría de masas. Los números sobre el gel identifican las secciones obtenidas a partir de las correspondientes bandas.

DISCUSIÓN

El objetivo inicial de esta tesis, era caracterizar genes con potencial oncogénico que pudieran participar en transformación tumoral maligna, más allá de la consecución de la inmortalidad replicativa. Además, cuantificar la contribución en transformación tumoral mediante ensayos funcionales de los genes candidatos y profundizar en las bases moleculares de los procesos patobiológicos en los cuales estuvieran implicados.

Para identificar cuál/cuales podrían ser estos genes comparamos el transcriptoma de linfocitos B inmortalizados, pero no tumorales, con el de células tumorales de linfoma B. Esta comparación nos permitió detectar 543 genes regulados diferencialmente más de 3 veces. Del total de genes diferencialmente expresados focalizamos nuestra atención en 2 posibles reguladores transcripcionales, CDCA7 e ID3, por su potencial regulador de programas de expresión génica implicados en procesos de transformación. Aunque las diferencias de expresión de ID3 pudieron ser validadas a nivel de RNA mediante RTq-PCR, no se encontraron diferencias de expresión a nivel de proteína utilizando un anticuerpo comercial. Por lo que decidimos centrar nuestro estudio en CDCA7. Independientemente del nivel de expresión de ID3, dos estudios publicados durante la realización de esta tesis han mostrado que este gen se encuentra recurrentemente inactivado por mutaciones en linfoma de Burkitt y que estas mutaciones podrían ser relevantes desde el punto de vista patogénico y clínico (Love *et al.*, 2012; Richter *et al.*, 2012). En vista de estos resultados, aunque nuestros datos no sean suficientes para descartar que la proteína ID3 pudiera encontrarse sobre-expresada no consideramos conveniente emplear anticuerpos adicionales para estudiar sus niveles de expresión y continuar con el estudio de esta proteína.

CDCA7 es una proteína de función desconocida. Hasta la fecha, no existen indicaciones claras del papel oncogénico de CDCA7. Según estudios previos llevados a cabo en diferentes modelos murinos, esta proteína no sólo tiene un débil papel transformante (Prescott *et al.*, 2001; Osthus *et al.*, 2005) sino que incluso se sugiere un papel inhibidor de la transformación inducida por c-myc, según una reciente publicación (Gill *et al.*, 2013).

Nosotros encontramos que la expresión de CDCA7 en biopsias de pacientes de sBL y de DLBCL fue superior a la detectada en tejidos control (amígdalas reactivas). Esto

sugiere que la desregulación de CDCA7 podría no ser específica de BL sino que podría ser un evento generalizado extensible a neoplasias linfocíticas. De hecho, se observan unos altos niveles de expresión de CDCA7 en líneas celulares procedentes de neoplasias de todo el compartimento linfocitario incluyendo BL, DLBCL, FL, MCL, B-ALL y T-ALL. Ya que la reducción de los niveles de expresión de esta proteína tiene un fuerte impacto en la capacidad de crecer con independencia de anclaje y de formar tumores en diferentes líneas de neoplasias linfocíticas, proponemos a CDCA7 como un posible mediador del proceso de transformación tumoral linfocítica.

Aunque los bajos niveles de expresión de CDCA7 en varias líneas celulares mieloides sugieren un papel dudoso en su transformación, no se puede descartar que unos niveles mínimos de expresión de CDCA7 en el compartimento mielóide sean suficientes para desencadenar el proceso transformante. En este último escenario, una reducción de los niveles de CDCA7 en líneas de origen mielóide se vería acompañado de una reducción de sus capacidades tumorigénicas de forma análoga a lo observado para el compartimento linfocítico.

CDCA7 había sido descrita como una proteína con localización nuclear (Prescott *et al.*, 2001). Sin embargo, según una reciente publicación, CDCA7 presenta una distribución nucleo-citoplásmica, describiéndose que CDCA7 se encuentra interaccionando con C-MYC en el compartimento nuclear y que la fosforilación de CDCA7 por AKT (proteína quinasa B) causa su disociación de C-MYC y su posterior exportación al citosol (Gill *et al.*, 2013). Nosotros, previamente a la publicación de estos datos, detectamos la presencia de CDCA7 en el compartimento citosólico y nuclear en las líneas de BLs mientras que sólo detectamos CDCA7 en el compartimento citosólico en las LCLs (R. Jiménez-P y M.R. Campanero, datos preliminares no publicados). La presencia de CDCA7 en el núcleo de las células de BLs podría estar relacionado con la existencia un mecanismo patogénico subyacente en neoplasias linfoides, que no existiría en la LCLs analizadas.

Cómo ya habíamos comentado anteriormente, CDCA7 se encuentra transcripcionalmente regulado positivamente, tanto por MYC (Prescott *et al.*, 2001), como por los factores de transcripción E2F1, E2F2, E2F3 y E2F4, en orden decreciente (Goto *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito que las líneas de BL, además de la

obligatoria sobreexpresión de C-MYC, presentan elevados niveles de E2F1 (Molina-Privado *et al.*, 2009). Por lo tanto, una sobreexpresión de CDCA7 en las líneas de BL estaría en consonancia con lo previamente publicado. Sin embargo, nosotros encontramos altos niveles de expresión de CDCA7 en líneas celulares de distinto origen hematológico como DLBCL, FL, MCL, ALL-T y ALL-B distintas de BL lo cual sugiere la existencia de mecanismos adicionales de regulación a los previamente descritos.

Por otro lado, se sabe que la proteína TCL1 está sobreexpresada en una amplia variedad de neoplasias humanas, incluyendo varios tipos de neoplasias linfoides como, por ejemplo, leucemia prolinfocítica T (Virgilio *et al.*, 1998; Narducci *et al.*, 2000), linfomas de células B infectados con el virus de Epstein Barr (EBV) y asociados a inmunodeficiencias (Fu *et al.*, 1994; Narducci *et al.*, 2000; Said *et al.*, 2001; Herling *et al.*, 2007). Se ha demostrado que TCL1 es un poderoso oncogen de célula B y que está probablemente implicado en la patogénesis de varios tipos de linfomas de células B maduras (Hoyer *et al.*, 2002). El linfoma de Burkitt, un tipo de neoplasia que proviene de una célula de centro germinal negativa para la expresión de TCL1, es el tipo de linfoma con la más consistentemente alta expresión de TCL1 (Rodig *et al.*, 2008; Aggarwal *et al.*, 2009). Sin embargo en nuestro array no hemos encontrado diferencias de expresión entre el *pool* de LCL y BL probablemente porque la infección con EBV produce una sobreactivación de AKT mediada a su vez por una sobreexpresión de TCL1 ((Hoyer *et al.*, 2002; Bell y Rickinson, 2003; Kiss *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha demostrado una positividad en la expresión de TCL1 entre un 18% y un 60% de los casos de DLBCLs de pacientes adultos (Nakayama *et al.*, 2000; Narducci *et al.*, 2000). Otros tipos de linfomas, incluidos linfomas de precursores de células B y T, presentan gran variabilidad de expresión de TCL1 (Aggarwal *et al.*, 2009).

1. DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CDCA7 EN NEOPLASIAS LINFOCÍTICAS Y CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DEL FENOTIPO TUMORAL.

La reducción de CDCA7 en las diferentes líneas de origen linfocítico produce una reducción dramática de su capacidad de crecer con independencia de anclaje. Esta reducción de la capacidad clonogénica varía entre el 80% y el 95% respecto del control. Debido a que no encontramos diferencias en proliferación o en ciclo celular, ni un incremento en la muerte celular en experimentos de sensibilización a drogas y a privación de suero, todo parece indicar que la célula deficiente en CDCA7 tiene un comportamiento diferente en medio semisólido (agar blando) que en cultivo normal (suspensión). El efecto observado en agar blando podría ser debido, entre otras causas, a un comportamiento senescente de las células en este medio, a la inhibición de su proliferación y/o a la muerte celular por pérdida de señales mediadas por integrinas, o al desarrollo de un mecanismo de autofagia en las células silenciadas cultivadas en este medio.

La senescencia se describió originalmente como un estado terminal en el que las células normales humanas no se dividen tras haber alcanzado un número de divisiones en cultivo. Se demostró que la causa se debía a un acortamiento de los telómeros que conduce a una disfunción del telómero y a la detención del ciclo celular. Posteriormente se describió una forma más rápida de senescencia prematura, no dependiente del telómero, inducida por estrés. Dentro de estos estreses, cabe destacar el que se produce como respuesta a la activación oncogénica, llamada oncosenescencia y que está implicada en la supresión de tumores *in vivo*. Un segundo fenómeno que juega un papel en la supresión de tumores, que involucra un acortamiento de los telómeros progresivo, es la crisis que las células alcanzan cuando los puntos de control del ciclo celular se deterioran y las células ya no pueden responder a acortamiento de los telómeros. Estos dos procesos, la senescencia inducida por oncogenes y la crisis de los telómeros ejercen potentes efectos anticancerígenos.

Un paso crucial en la progresión tumoral maligna es la adquisición de la resistencia a la anoikis, una forma de la apoptosis inducida por pérdida de la adhesión o una inapropiada adhesión a la matriz extracelular. La adquisición de la resistencia a la anoikis permite que las células tumorales puedan invadir tejidos adyacentes así como

difundir a través del cuerpo dando lugar a las metástasis (Guadamillas *et al.*, 2011). Nuestras observaciones son compatibles con que el silenciamiento de CDCA7 sensibiliza a la célula frente un tipo de muerte celular derivada de una inapropiada adhesión a la matriz extracelular. Nuestros resultados podrían indicar que CDCA7 está mediando en una ruta de protección frente a este tipo de muerte celular. De hecho, un análisis funcional de la proteína TCL-1 reveló su participación en una vía prosupervivencia a través de su interacción con la quinasa AKT (Pekarsky *et al.*, 2001). Esta interacción promueve la translocación de AKT al núcleo y aumenta la actividad enzimática de AKT (Pekarsky *et al.*, 2001). Aunque la secuencia de localización nuclear (NLS) de AKT es desconocida, la familia de proteínas leucemia de células T-1 (TCL-1) pueden estar implicadas en la localización nuclear de AKT como se demostró por primera vez en leucemia humana de células T (Pekarsky *et al.*, 2000).

AKT es una serina/treonina quinasa que constituye un importante nodo de señalización y que forma parte de la ruta de PI3K/AKT/mTOR. AKT está implicada en multitud procesos, algunos de ellos tan importantes como la supervivencia (Tan *et al.*, 2000; Hirai y Wang, 2001), el ciclo celular (Hsieh *et al.*, 2011) y migración/invasión (Cheng *et al.*, 2008). Existen abundantes pruebas que implican a la vía PI3K/AKT/mTOR en el desarrollo y la progresión de una variedad de tumores, incluyendo neoplasias hematológicas (Kawauchi *et al.*, 2009; Barrett *et al.*, 2012). La presencia de una forma activa de AKT fosforilada (p-AKT) dentro del núcleo ha sido descrita desde finales de 1990. De este modo, el mecanismo molecular de activación de la ruta de AKT en neoplasias linfocíticas estaría mediado por la sobreexpresión del oncogén TCL-1 como consecuencia de translocaciones cromosómicas t(14;14) o t(7;14) o inversión (inv14) (Narducci *et al.*, 2000).

La sobreexpresión de TCL-1 en una gran variedad de neoplasias de origen linfoide podría originar una sobreactivación de p-AKT nuclear. Se sabe que p-AKT regula al alza la actividad transcripcional y la actividad histona acetiltransferasa de p300 (Huang y Chen, 2005), la cual está implicada en la transcripción del gen de la ciclina D1 (*CCND1*) y en la acetilación de histonas del promotor de la ciclina D1 (Ji *et al.*, 2008). Por otro lado, p-Akt inhibe la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β) que es la responsable de la exportación de la ciclina D1 del núcleo para su posterior degradación vía ubiquitina-proteosoma (Diehl *et al.*, 1998). Mediante estos dos mecanismos, se

produce una sobreexpresión de la ciclina D1 la cual es una proteína implicada en la fosforilación de proteínas de la familia de retinoblastoma (pRB) a través de la activación de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Wikman y Kettunen, 2006). La fosforilación de pRB por estas quinasas dependientes de ciclinas (CDK4 y CDK6) provoca la disociación de los heterodímeros pRB-E2F represores, y su disociación del ADN liberando los sitios de unión para E2F y permitiendo la entrada de los factores E2F activadores (E2F1, E2F2 y E2F3a) que, a su vez, regularán la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y, como hemos dicho anteriormente, la expresión de CDCA7.

La forma nuclear de AKT (p-AKT), es la que mediante dos mecanismos distintos podría inducir la expresión y activación de CDCA7. La inducción vendría dada por la vía AKT/Ciclina D1/pRB-E2F y su activación mediante fosforilación directa de CDCA7 (pCDCA7) por AKT nuclear. En este último escenario, el factor de transcripción E2F1 induciría la expresión de CDCA7 de forma independiente de MYC. Este mecanismo permitiría explicar que CDCA7 se encuentre sobreexpresado en líneas celulares linfocíticas independientemente del estatus de C-MYC y débilmente expresado en líneas celulares de origen mieloide.

Nosotros hemos determinado que la reducción de los niveles de expresión de CDCA7 en diferentes líneas celulares de origen linfocítico, no sólo produce una dramática reducción de su capacidad de crecimiento independientemente de anclaje *in vitro*, sino que al mismo tiempo, reduce las capacidades tumorigénicas de estas células *in vivo*. Estos resultados apuntan a que CDCA7 podría estar implicado en procesos de la transformación tumoral maligna posteriores a la consecución del fenotipo inmortalizado. Mediante la caracterización funcional que se ha llevado a cabo en esta tesis, hemos concluido que unos altos niveles de expresión de CDCA7 contribuyen al mantenimiento de un fenotipo transformado y que su silenciamiento revierte a las células transducidas a un estado previo de características de crecimiento similares a las de las LCLs; es decir, células inmortales, pero no tumorales.

Como ya hemos comentado anteriormente, AKT fosforila a CDCA7 en un proceso que hace que se disocie de MYC, y que sea exportado al citoplasma en asociación con la proteína 14-3-3 (Gill *et al.*, 2013). En este contexto, CDCA7 podría formar parte de

la ruta PI3K/AKT/mTOR y mediar los conocidos efectos de supervivencia y resistencia a la apoptosis inducida por AKT. En este escenario, terapias dirigidas contra la ruta PI3K/AKT/mTOR, que sensibilizan a la célula tumoral a la apoptosis, podrían estar actuando mediante la acumulación del complejo CDCA7-MYC en el núcleo. Según un reciente estudio, esta sensibilización es observada cuando se aplica el fármaco curcumina (un inhibidor de la ruta de AKT) en diferentes líneas de BL (Qiao *et al.*, 2013). Sin embargo, los resultados de nuestros experimentos de sensibilización a apoptosis nos sugieren que el silenciamiento de CDCA7 no produce una predisposición a la apoptosis derivada de tratamientos quimioterapéuticos, ni frente a privación de suero. De este modo, estos resultados nos sugieren que el papel de CDCA7 en apoptosis podría estar restringido a aquellos procesos de muerte celular derivada de una pérdida de anclaje o una inapropiada adhesión a la matriz extracelular.

El silenciamiento de CDCA7 en HEK293-T no produce una disminución del número de colonias. Este resultado podría deberse a que no es suficiente una sobreexpresión de CDCA7 sino que adicionalmente se necesita un procesamiento o activación adicional que no está presente en este tipo celular. De hecho, en este tipo celular no hay sobreexpresión de TCL-1 (Gaudio *et al.*, 2012), lo cual indica que no hay sobreactivación de p-AKT y por consiguiente no hay una fosforilación de CDCA7.

El silenciamiento de CDCA7 produce una reducción de la capacidad tumorigénica de las líneas celulares procedentes de neoplasias linfocíticas. Este efecto fue determinado mediante el uso de modelos murinos de xenotransplante y aunque el efecto observado no es tan marcado como el observado en los ensayos de crecimiento en agar blando, sí que detectamos diferencias estadísticamente significativas. Este resultado, podría deberse al hecho de que las células empleadas en el modelo de xenotransplante se encuentran condicionadas por multitud de señales prosupervivencia que no están presentes obviamente en el ensayo *ex vivo* de agar blando. Además de los factores de crecimiento solubles y hormonas, en este tipo de ensayo entran en juego las integrinas. Las integrinas son heterodímeros α/β presentes en la membrana plasmática que median procesos de adhesión a la matriz extracelular (ECM) y a los receptores de otras células. El genoma de mamíferos codifica para 26 genes de integrinas (18 α y 8 β), los cuales forman 24 heterodímeros. Las integrinas detectan el anclaje celular, ya sea a superficies sólidas o a otras células, y juegan un papel en múltiples procesos

relacionados con el cáncer, incluyendo *homing*, adhesión, motilidad, proliferación y apoptosis (Guo y Giancotti, 2004; Desgrosellier y Cheresch, 2010). Estas proteínas regulan la mayoría de las cascadas de señalización relacionadas con la proliferación celular, incluyendo las rutas de la proteína quinasa Erk activada por mitógenos (MAPK), Src, fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), la quinasa de adhesión focal (FAK) y Rho GTPasa. La coordinación de señales provenientes de los receptores de factores de crecimiento y los receptores de ECM permite la proliferación dependiente de anclaje (Martin *et al.*, 2002; Schwartz y Ginsberg, 2002; Burrridge y Wennerberg, 2004; Assoian y Klein, 2008).

Por otro lado, las integrinas no ligadas también pueden actuar como promotores de muerte celular a través de un proceso llamado "muerte celular mediada por integrina" (IMD) (Brassard *et al.*, 1999; Stupack *et al.*, 2001). A diferencia de la "clásica" anoikis, IMD no implica necesariamente la pérdida del anclaje con la ECM ya que este fenómeno puede ser disparado por integrinas no ligadas en células en una situación de adhesión por lo demás normal. IMD ha sido descrito en células epiteliales, tanto para la integrina $\beta 1$ como para la $\beta 3$. En este proceso, se produce el reclutamiento de la caspasa-8 por el dominio citoplasmático de la subunidad β de la integrina con la consiguiente aparición de la respuesta apoptótica (Stupack *et al.*, 2001; Lotti *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). De vez en cuando, ciertas células pueden escapar al control de la proliferación mediado por integrinas, una característica conocida como crecimiento independiente de anclaje (AIG), la cual es una característica de la mayoría de las células transformadas (Freedman y Shin, 1974). En el ensayo de agar blando observamos que células transformadas con potencial para desarrollar un AIG pierden casi totalmente esta capacidad al reducir la expresión de CDCA7, lo que sugiere que CDCA7 podría estar implicado en la regulación de las señales que normalmente transducen las integrinas. Sin embargo, la reducción de los niveles de CDCA7 no afecta tan drásticamente al crecimiento de las células de neoplasia linfóide en el modelo de xenotransplante, lo que podría ser debido a la mayor complejidad de la composición del microambiente tisular. En este caso, las integrinas de las células neoplásicas podrían estar interaccionando con receptores de otras células y con proteínas de la ECM (fibronectina, vitronectina, colágeno, etc), actuando como una fuente de estímulos de crecimiento y supervivencia. En este escenario, la célula integra todas estas señales permitiéndole sobrepasar moderadamente la limitación impuesta por la reducción de los

niveles de CDCA7. En este sentido, hay estudios en los que se pone de relevancia la importancia de la señalización de las integrinas en el desarrollo de la leucemia, como es el caso del eje de señalización ITGB3/SYK. Se ha comprobado que la integrina $\beta 3$ es esencial para el desarrollo de la leucemia mieloide y su depleción reduce su crecimiento, supervivencia y *homing* e induce diferenciación (Miller *et al.*, 2013). Por otro lado, la inhibición de la tirosina quinasa SYK, un mediador de la ruta de ITGB3, ha demostrado ser efectiva para el tratamiento de procesos alérgicos, enfermedades autoinmunes y neoplasias de células B (Mocsai *et al.*, 2010).

Los datos de la intervención de CDCA7 en transformación maligna han sido obtenidos trabajando con 3 modelos de linfoma de Burkitt y se han validado, además, en las líneas de DLBCL Toledo y de ALL-T Molt-4. De modo que, independientemente de cuál sea el mecanismo molecular por el cual el silenciamiento de CDCA7 inhibe el crecimiento tumoral de estas células; los resultados apuntan a que CDCA7 es un mediador central de la transformación tumoral de neoplasias de origen linfocítico y sugieren que podría estar implicado en un mecanismo general de transformación neoplásica de todo el compartimento hematológico. Para corroborar esta hipótesis sería conveniente extender nuestros estudios a líneas celulares pertenecientes al compartimento mieloide. Sin embargo, los bajos niveles de expresión de CDCA7 mostrados por las diferentes líneas celulares del compartimento mieloide, nos sugieren 2 cosas: (1) que el mecanismo de transformación tumoral en este compartimento podría ser independiente de la sobreexpresión de CDCA7, de modo que un silenciamiento de esta proteína no reduciría las características pro-tumorigénicas de estas células, o bien (2) que estas células sean más sensibles a la presencia de CDCA7, de manera que unos niveles de expresión de CDCA7 inferiores al detectado en neoplasias del compartimento linfocítico fueran suficientes para producir o mantener las características pro-tumorigénicas. En este último escenario, una reducción de CDCA7 con shRNAs igualmente produciría unos efectos análogos a los estudiados en esta tesis para las neoplasias linfocíticas.

2. LA REDUCCIÓN DE CDCA7 PRODUCE UNA REDUCCIÓN DE LAS CAPACIDADES MIGRATORIAS E INVASIVAS.

El desarrollo tumoral se describe generalmente como resultado de sucesivas oleadas de cambios genéticos y epigenéticos y de selecciones darwinianas que permiten la aparición progresiva de las células con ventajas de proliferación y supervivencia. De acuerdo con este modelo de progresión tumoral, la adquisición de propiedades migratorias/metastásicas se percibe como una etapa tardía inducida por la respuesta a las condiciones ambientales desfavorables en el tumor, en particular el oxígeno y la falta de nutrientes (Ansieau y Puisieux, 2011).

Dado que las capacidades migratorias y de invasión también se encuentran afectadas normalmente en las células tumorales, determinamos el efecto del silenciamiento de CDCA7 sobre las propiedades migratorias e invasivas de las células de BL. De este modo, mediante ensayos de invasión/migración *in vivo* en pez cebra y *ex vivo* en transwell y videolapse, detectamos una pérdida de las capacidades de migración de las células DG-75 derivadas del silenciamiento de CDCA7. Paralelamente a estas observaciones, también detectamos un incremento de la extensión celular y del grado de nucleación de la actina o actina filamentosa (F-actina) en las células silenciadas. Este incremento de la actina filamentosa en células silenciadas sugiere que CDCA7 podría funcionar como un inhibidor de la polimerización de la actina. De modo que una disminución de las capacidades migratorias/invasivas observadas para las células DG-75 podría ser consecuencia directa de una descompensación en la dinámica de polimerización/despolimerización de la actina. Hay que recordar que los efectos observados en extensión celular y grado de nucleación de la actina fueron observados utilizando cubres recubiertos de fibronectina. La fibronectina es rica en motivos Arg-Gly-Asp (RGD) (Hynes, 2002; Humphries *et al.*, 2006), los cuales están implicados en la unión a la integrina $\alpha_5\beta_1$ y a todas las integrinas de la clase α_v , como por ejemplo $\alpha_v\beta_3$. En un reciente estudio estas dos integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$ cooperan en un sistema sinérgico el cual es importante para adaptar la contractilidad y la arquitectura celular a los microambientes basados en fibronectina (Schiller *et al.*, 2013). En este mismo estudio se describe como células KO para α_v indujo mayores adhesiones focales y una mayor empaquetamiento de la actina en tres líneas celulares diferentes (Schiller *et al.*, 2013). Ya que tanto el KO de α_v como nuestro knowdown para CDCA7 producen el

mismo fenotipo, no podemos descartar que CDCA7 medie en la señalización de la integrina α_v .

Estas observaciones nos llevaron a preguntarnos en qué mecanismo molecular podría estar implicado CDCA7 para producir los efectos observados tanto en migración como en tumorigénesis. Se ha sugerido que podría funcionar como un activador o co-activador transcripcional (Goto *et al.*, 2006). Se nos ofreció la oportunidad de comparar mediante secuenciación masiva el transcriptoma de células control con el de células transducidas con los shRNA de CDCA7 sh25 y 2h83. Se trata de un estudio preliminar y serán necesarias réplicas experimentales para poder sacar conclusiones sólidas de estos estudios, pero este resultado preliminar reveló diferencias en el transcriptoma de estas poblaciones celulares. Aunque el análisis bioinformático reveló que la diferencia de expresión detectada entre la población control y las silenciadas era estadísticamente significativa en algunos casos, no hemos considerado relevantes estas diferencias hasta no obtener datos de réplicas experimentales. Es de destacar que CDCA7 era uno de los pocos genes cuya expresión resultó inhibida de forma significativa en las células silenciadas. Otro de los genes cuya expresión estaba inhibida en las células silenciadas era "*lipoma preferred partner*" (LPP).

Esta proteína pertenece a la familia Zyxin de proteínas con dominio LIM. Los miembros de esta familia están implicados en migración celular, remodelación del citoesqueleto de actina y tumorigénesis (Yi y Beckerle, 1998; Hirota *et al.*, 2000; Pratt *et al.*, 2005; Willier *et al.*, 2011). Estudios de la proteína LPP en células del músculo liso (SMC), en el cual es altamente expresado, han demostrado su papel promoviendo la migración celular, la adhesión y la formación de extensiones lamelipodiales (Gorenne *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2003; Majesky, 2006; Jin *et al.*, 2007; Vervenne *et al.*, 2008; Grunewald *et al.*, 2009).

En nuestro ensayo preliminar de secuenciación masiva, observamos que la disminución de CDCA7 se acompaña de una reducción de LPP y hemos demostrado que, en este contexto, las células DG-75 pierden sus capacidades migratorias. Inversamente, la sobreexpresión de LPP potencia la migración mediada por EGF de las SMCs vasculares, mientras que fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) LPP-nulos exhiben una reducción de la migración celular, destacando aún más la participación de

LPP en la regulación de la motilidad celular (Gorenne *et al.*, 2003) (Vervenne *et al.*, 2009). LPP interacciona con numerosas proteínas que se localizan en los contactos célula-célula y adherencias focales, tales como α -actinina, fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP), Scrib, Palladin y LIM y proteína 1 de dominio SH3 (LASP-1), todos ellos con función moduladora del citoesqueleto de actina y que además han sido implicados en cánceres humanos (Li *et al.*, 2003; Keicher *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007; Vervenne *et al.*, 2008; Grunewald *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Recientemente también se ha demostrado que LPP es requerido para la migración celular inducida por TGF β , la invasión celular y el recambio de la adhesión focal en células tumorales de mama que expresan ErbB2 y que experimentan una transición epitelio-mesénquima (EMT) en respuesta a TGF β (Ngan *et al.*, 2013). De esta manera, LPP se presenta como una proteína candidata para la explicación de los fenotipos migratorios derivados del silenciamiento de CDCA7. Una forma de verificar esta hipótesis sería sobreexpresando LPP en células silenciadas de modo que si nuestra hipótesis fuera cierta podríamos rescatar el fenotipo.

A pesar de que LPP podría ser una candidata muy atractiva para explicar los efectos en migración de CDCA7, no podemos descartar la participación de otros moduladores del citoesqueleto celular como son zyxin, palladin, Scrib, α -actinina y LASP-1 y VASP; esta última implicada en la dinámica de polimerización de la actina y en la formación de protrusiones celulares (Hansen y Beckerle, 2006).

Otra aproximación que llevamos a cabo consistió en estudiar los posibles interactores con el fin de obtener información sobre las rutas en las que podría estar participando CDCA7 y de esta manera buscar una explicación de los efectos observados tras su silenciamiento. Con este fin se diseñó un experimento de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-CDCA7 S99 utilizando extracto total de células DG-75. En estos ensayos se detectaron varias bandas diferencialmente representadas entre los extractos inmunoprecipitados con el anticuerpo específico S99 y los inmunoprecipitados con el correspondiente suero pre-inmune. La mayoría de estas bandas pertenecían a proteínas relacionadas con el citoesqueleto celular y más concretamente con el eje actina/miosina. Algunos de estos presuntos interactores fueron: MYH9, CAPZA1, ARP2/3, ACTG1, ACTB, TPM3, MYL12A, MYL12B y MYL6, los cuales han sido descritos por tener un papel en motilidad celular (Even-Ram y Yamada, 2007), (Bartolini *et al.*, 2012),

(Vartiainen y Machesky, 2004), (Belyantseva *et al.*, 2009), (Bunnell *et al.*, 2011), (Schevzov *et al.*, 2012) y (Park *et al.*, 2011). De estos posibles interactores, se han validado, por el momento, β -Actina y MYH9 como interactores de CDCA7 mediante IP-WB (R. Jiménez-P., Y. Chiodo y M.R. Campanero, datos no publicados). Estas proteínas están implicadas en estructura, integridad, citocinesis, forma y motilidad celular. Estos resultados sugieren que la interacción de CDCA7 con estas proteínas podría regular su funcionalidad.

Aunque las funciones precisas de CDCA7 permanecen enigmáticas, los resultados presentados en esta tesis sugieren que CDCA7 podría ser un factor de transformación tumoral importante regulado por las redes de transcripción de la familia E2F y de C-MYC. Además, como se pone de manifiesto en los ensayos de agar blando y xenotransplante, CDCA7 es un mediador central de la linfomagénesis. Por otro lado CDCA7 parece estar implicado en procesos relacionados con la dinámica del citoesqueleto celular y afectando consecuentemente a la extensión celular y a las capacidades migratorias e invasivas de las células. Este efecto parece ser inducido como consecuencia de un desbalance en el grado de nucleación de la actina, presentándose CDCA7 como un inhibidor directo o indirecto de la polimerización de esta proteína.

En conjunto, nuestros datos apoyan que CDCA7 podría estar implicado en la transición hacia un estadio tumoral avanzado posterior a la adquisición de la inmortalidad replicativa. Dado que la expresión elevada de CDCA7 es necesaria para el crecimiento tumoral *in vivo* y para la invasión tumoral, el diseño de un fármaco dirigido contra la función o la expresión de CDCA7 podría tener un efecto beneficioso para el tratamiento de determinadas neoplasias de origen hematológico. Estos datos, junto a la inocuidad del silenciamiento de CDCA7 observada en las fibroblastos primarios de piel humana, sugieren que una terapia dirigida contra CDCA7 podría inhibir el crecimiento del tumor primario e inhibir la formación de metástasis sin desencadenar efectos colaterales perjudiciales para las células somáticas normales.

CONCLUSIONES

1. El transcriptoma de linfocitos B inmortales, pero no tumorales, difiere ampliamente del transcriptoma de las células de linfoma de Burkitt con independencia de la presencia del virus de Epstein-Barr.

2. Las biopsias de pacientes y las líneas celulares de neoplasias linfocitarias expresan niveles de CDCA7 mucho más elevados que los tejidos control de referencia y que las líneas celulares de linfocitos inmortalizados, pero no tumorales, respectivamente.

3. La expresión elevada de CDCA7 en neoplasias linfoides es necesaria para el mantenimiento de su fenotipo tumoral, pero no para su crecimiento *ex vivo* en condiciones normales de cultivo.

4. La reducción de la expresión de CDCA7 en neoplasias linfoides inhibe su potencial migratorio e invasivo tanto *in vitro* como *in vivo*.

5. La alteración de la dinámica de formación de actina filamentosa por niveles elevados de CDCA7 podría ser uno de los mecanismos implicados en la inhibición de la formación de extensiones celulares y en el fomento de la capacidad migratoria e invasiva de las neoplasias linfoides.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. M.; Harris, A. W.; Pinkert, C. A.; Corcoran, L. M.; Alexander, W. S.; Cory, S.; Palmiter, R. D. y Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Adhikary, S. y Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 635-645.
- Aggarwal, M.; Villuendas, R.; Gomez, G.; Rodriguez-Pinilla, S. M.; Sanchez-Beato, M.; Alvarez, D.; Martinez, N.; Rodriguez, A.; Castillo, M. E.; Camacho, F. I.; Montes-Moreno, S.; Garcia-Marco, J. A.; Kimby, E.; Pisano, D. G. y Piris, M. A. (2009). TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 22, 206-215.
- Alvaro-Blanco, J.; Martinez-Gac, L.; Calonge, E.; Rodriguez-Martinez, M.; Molina-Privado, I.; Redondo, J. M.; Alcamí, J.; Flemington, E. K. y Campanero, M. R. (2009). A novel factor distinct from E2F mediates C-MYC promoter activation through its E2F element during exit from quiescence. *Carcinogenesis* 30, 440-448.
- Ansieau, S. y Puisieux, A. (2011). [An alternate model of tumoral progression]. *Biol Aujourd'hui* 205, 47-52.
- Armitage, J. O. y Weisenburger, D. D. (1998). New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 16, 2780-2795.
- Asoian, R. K. y Klein, E. A. (2008). Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol* 18, 347-352.
- Baena, E.; Gandarillas, A.; Vallespinos, M.; Zanet, J.; Bachs, O.; Redondo, C.; Fabregat, I.; Martinez, A. C. y de Alboran, I. M. (2005). c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7286-7291.
- Bakshi, N. y Maghfoor, I. (2012). The current lymphoma classification: new concepts and practical applications triumphs and woes. *Ann Saudi Med* 32, 296-305.
- Barrett, D.; Brown, V. I.; Grupp, S. A. y Teachey, D. T. (2012). Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies. *Paediatr Drugs* 14, 299-316.
- Bartolini, F.; Ramalingam, N. y Gundersen, G. G. (2012). Actin-capping protein promotes microtubule stability by antagonizing the actin activity of mDia1. *Mol Biol Cell* 23, 4032-4040.

- Belyantseva, I. A.; Perrin, B. J.; Sonnemann, K. J.; Zhu, M.; Stepanyan, R.; McGee, J.; Frolenkov, G. I.; Walsh, E. J.; Friderici, K. H.; Friedman, T. B. y Ervasti, J. M. (2009). Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9703-9708.
- Bell, A. y Rickinson, A. B. (2003). Epstein-Barr virus, the TCL-1 oncogene and Burkitt's lymphoma. *Trends Microbiol* 11, 495-497.
- Ben-Bassat, H.; Goldblum, N.; Mitrani, S.; Goldblum, T.; Yoffey, J. M.; Cohen, M. M.; Bentwich, Z.; Ramot, B.; Klein, E. y Klein, G. (1977). Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer* 19, 27-33.
- Brassard, D. L.; Maxwell, E.; Malkowski, M.; Nagabhushan, T. L.; Kumar, C. C. y Armstrong, L. (1999). Integrin alpha(v)beta(3)-mediated activation of apoptosis. *Exp Cell Res* 251, 33-45.
- Bunnell, T. M.; Burbach, B. J.; Shimizu, Y. y Ervasti, J. M. (2011). beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell* 22, 4047-4058.
- Burridge, K. y Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Campanero, M. R. y Flemington, E. K. (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2221-2226.
- Conde, E.; Suarez-Gauthier, A.; Garcia-Garcia, E.; Lopez-Rios, F.; Lopez-Encuentra, A.; Garcia-Lujan, R.; Morente, M.; Sanchez-Verde, L. y Sanchez-Cespedes, M. (2007). Specific pattern of LKB1 and phospho-acetyl-CoA carboxylase protein immunostaining in human normal tissues and lung carcinomas. *Hum Pathol* 38, 1351-1360.
- Cheng, G. Z.; Zhang, W. y Wang, L. H. (2008). Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res* 68, 957-960.
- Dalla-Favera, R.; Bregni, M.; Erikson, J.; Patterson, D.; Gallo, R. C. y Croce, C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7827.
- Dang, C. V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 1-11.
- de Alboran, I. M.; Baena, E. y Martinez, A. C. (2004). c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. *Cell Death Differ* 11, 61-68.

- de Alboran, I. M.; O'Hagan, R. C.; Gartner, F.; Malynn, B.; Davidson, L.; Rickert, R.; Rajewsky, K.; DePinho, R. A. y Alt, F. W. (2001). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity* 14, 45-55.
- Desgrosellier, J. S. y Cheresch, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.
- Díaz-Regañón, I. R. (2006). NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS. In *Tratado de geriatría para residentes*, (Madrid), pp. 667-677.
- Diehl, J. A.; Cheng, M.; Roussel, M. F. y Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Drexler, H. G. (2000). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 24, 109-115.
- Drexler, H. G. y MacLeod, R. A. (2003a). Leukemia-lymphoma cell lines as model systems for hematopoietic research. *Ann Med* 35, 404-412.
- Drexler, H. G. y MacLeod, R. A. (2003b). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mast cell leukemia. *Leuk Res* 27, 671-676.
- Drexler, H. G. y MacLeod, R. A. (2004). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of anaplastic large-cell lymphoma. *Leukemia* 18, 1569-1571.
- Drexler, H. G. y Macleod, R. A. (2009). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of plasmacytoid dendritic cell leukemia. *Leuk Res* 33, 1166-1169.
- Drexler, H. G.; Matsuo, A. Y. y MacLeod, R. A. (2000). Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. *Leuk Res* 24, 881-911.
- Drexler, H. G. y Matsuo, Y. (2000a). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Res* 24, 681-703.
- Drexler, H. G. y Matsuo, Y. (2000b). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of natural killer cell leukemia-lymphoma. *Leukemia* 14, 777-782.
- Drexler, H. G.; Matsuo, Y. y MacLeod, R. A. (2004). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of erythroleukemia. *Leuk Res* 28, 1243-1251.
- Drexler, H. G.; Quentmeier, H.; MacLeod, R. A.; Uphoff, C. C. y Hu, Z. B. (1995). Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res* 19, 681-691.

- Even-Ram, S. y Yamada, K. M. (2007). Of mice and men: Relevance of cellular and molecular characterizations of myosin IIA to MYH9-related human disease. *Cell Adh Migr* 1, 152-155.
- Felsher, D. W.; Zetterberg, A.; Zhu, J.; Tlsty, T. y Bishop, J. M. (2000). Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10544-10548.
- Freedman, V. H. y Shin, S. I. (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355-359.
- Fu, T. B.; Virgilio, L.; Narducci, M. G.; Facchiano, A.; Russo, G. y Croce, C. M. (1994). Characterization and localization of the TCL-1 oncogene product. *Cancer Res* 54, 6297-6301.
- Gaudio, E.; Spizzo, R.; Paduano, F.; Luo, Z.; Efanov, A.; Palamarchuk, A.; Leber, A. S.; Kaou, M.; Zanesi, N.; Bottoni, A.; Costinean, S.; Rassenti, L. Z.; Nakamura, T.; Kipps, T. J.; Aqeilan, R. I.; Pekarsky, Y.; Trapasso, F. y Croce, C. M. (2012). Tcl1 interacts with Atm and enhances NF-kappaB activation in hematologic malignancies. *Blood* 119, 180-187.
- Gill, R. M.; Gabor, T. V.; Couzens, A. L. y Scheid, M. P. (2013). The MYC-associated protein CDCA7 is phosphorylated by AKT to regulate MYC-dependent apoptosis and transformation. *Mol Cell Biol* 33, 498-513.
- Gorenne, I.; Nakamoto, R. K.; Phelps, C. P.; Beckerle, M. C.; Somlyo, A. V. y Somlyo, A. P. (2003). LPP, a LIM protein highly expressed in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C674-685.
- Goto, Y.; Hayashi, R.; Muramatsu, T.; Ogawa, H.; Eguchi, I.; Oshida, Y.; Ohtani, K. y Yoshida, K. (2006). JPO1/CDCA7, a novel transcription factor E2F1-induced protein, possesses intrinsic transcriptional regulator activity. *Biochim Biophys Acta* 1759, 60-68.
- Greaves, M. F. (1986). Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science* 234, 697-704.
- Grunewald, T. G.; Pasedag, S. M. y Butt, E. (2009). Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP. *Transl Oncol* 2, 107-116.
- Guadamillas, M. C.; Cerezo, A. y Del Pozo, M. A. (2011). Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* 124, 3189-3197.
- Guo, W. y Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.

- Haggerty, T. J.; Zeller, K. I.; Osthus, R. C.; Wonsey, D. R. y Dang, C. V. (2003). A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5313-5318.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hansen, M. D. y Beckerle, M. C. (2006). Opposing roles of zyxin/LPP ACTA repeats and the LIM domain region in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* *281*, 16178-16188.
- Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Diebold, J.; Flandrin, G.; Muller-Hermelink, H. K.; Vardiman, J.; Lister, T. A. y Bloomfield, C. D. (1999). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* *10*, 1419-1432.
- Herling, M.; Patel, K. A.; Hsi, E. D.; Chang, K. C.; Rassidakis, G. Z.; Ford, R. y Jones, D. (2007). TCL1 in B-cell tumors retains its normal b-cell pattern of regulation and is a marker of differentiation stage. *Am J Surg Pathol* *31*, 1123-1129.
- Hirai, I. y Wang, H. G. (2001). Survival-factor-induced phosphorylation of Bad results in its dissociation from Bcl-x(L) but not Bcl-2. *Biochem J* *359*, 345-352.
- Hirota, T.; Morisaki, T.; Nishiyama, Y.; Marumoto, T.; Tada, K.; Hara, T.; Masuko, N.; Inagaki, M.; Hatakeyama, K. y Saya, H. (2000). Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor. *J Cell Biol* *149*, 1073-1086.
- Hoyer, K. K.; French, S. W.; Turner, D. E.; Nguyen, M. T.; Renard, M.; Malone, C. S.; Knoetig, S.; Qi, C. F.; Su, T. T.; Cheroutre, H.; Wall, R.; Rawlings, D. J.; Morse, H. C., 3rd y Teitell, M. A. (2002). Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14392-14397.
- Hsieh, A. C.; Truitt, M. L. y Ruggero, D. (2011). Oncogenic AKTivation of translation as a therapeutic target. *Br J Cancer* *105*, 329-336.
- Huang, W. C. y Chen, C. C. (2005). Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* *25*, 6592-6602.
- Humphries, J. D.; Byron, A. y Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* *119*, 3901-3903.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.

- Imamura, J.; Miyoshi, I. y Koeffler, H. P. (1994). p53 in hematologic malignancies. *Blood* 84, 2412-2421.
- Jaffe, E. S.; Harris, N. L.; Stein, H. y Isaacson, P. G. (2008). Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112, 4384-4399.
- Ji, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Wang, X.; Yang, W. y Zhu, D. (2008). Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the PI3K/PTEN/Akt pathway. *Cell Signal* 20, 1452-1458.
- Jin, L.; Kern, M. J.; Otey, C. A.; Wamhoff, B. R. y Somlyo, A. V. (2007). Angiotensin II, focal adhesion kinase, and PRX1 enhance smooth muscle expression of lipoma preferred partner and its newly identified binding partner palladin to promote cell migration. *Circ Res* 100, 817-825.
- Kauffmann-Zeh, A.; Rodriguez-Viciana, P.; Ulrich, E.; Gilbert, C.; Coffey, P.; Downward, J. y Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544-548.
- Kawauchi, K.; Ogasawara, T.; Yasuyama, M.; Otsuka, K. y Yamada, O. (2009). Regulation and importance of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hematologic malignancies. *Anticancer Agents Med Chem* 9, 1024-1038.
- Keicher, C.; Gambaryan, S.; Schulze, E.; Marcus, K.; Meyer, H. E. y Butt, E. (2004). Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 308-316.
- Kirsch, I. R. y Ried, T. (2000). Integration of cytogenetic data with genome maps and available probes: present status and future promise. *Semin Hematol* 37, 420-428.
- Kiss, C.; Nishikawa, J.; Takada, K.; Trivedi, P.; Klein, G. y Szekely, L. (2003). T cell leukemia I oncogene expression depends on the presence of Epstein-Barr virus in the virus-carrying Burkitt lymphoma lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4813-4818.
- Klapproth, K. y Wirth, T. (2010). Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol* 149, 484-497.
- Kuppers, R.; Klein, U.; Hansmann, M. L. y Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529.
- Langdon, W. Y.; Harris, A. W.; Cory, S. y Adams, J. M. (1986). The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell* 47, 11-18.

- Lee, S.; Sakakibara, S.; Maruo, S.; Zhao, B.; Calderwood, M. A.; Holthaus, A. M.; Lai, C. Y.; Takada, K.; Kieff, E. y Johannsen, E. (2009). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C domains necessary for lymphoblastoid cell growth: interaction with RBP-Jkappa regulates TCL1. *J Virol* 83, 12368-12377.
- Li, B.; Zhuang, L.; Reinhard, M. y Trueb, B. (2003). The lipoma preferred partner LPP interacts with alpha-actinin. *J Cell Sci* 116, 1359-1366.
- Lombardi, L.; Newcomb, E. W. y Dalla-Favera, R. (1987). Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. *Cell* 49, 161-170.
- Lotti, R.; Marconi, A.; Truzzi, F.; Dallaglio, K.; Gemelli, C.; Borroni, R. G.; Palazzo, E. y Pincelli, C. (2010). A previously unreported function of beta(1)B integrin isoform in caspase-8-dependent integrin-mediated keratinocyte death. *J Invest Dermatol* 130, 2569-2577.
- Love, C.; Sun, Z.; Jima, D.; Li, G.; Zhang, J.; Miles, R.; Richards, K. L.; Dunphy, C. H.; Choi, W. W.; Srivastava, G.; Lugar, P. L.; Rizzieri, D. A.; Lagoo, A. S.; Bernal-Mizrachi, L.; Mann, K. P.; Flowers, C. R.; Naresh, K. N.; Evens, A. M.; Chadburn, A.; Gordon, L. I.; Czader, M. B.; Gill, J. I.; Hsi, E. D.; Greenough, A.; Moffitt, A. B.; McKinney, M.; Banerjee, A.; Grubor, V.; Levy, S.; Dunson, D. B. y Dave, S. S. (2012). The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet* 44, 1321-1325.
- Majesky, M. W. (2006). Organizing motility: LIM domains, LPP, and smooth muscle migration. *Circ Res* 98, 306-308.
- Martin, K. H.; Slack, J. K.; Boerner, S. A.; Martin, C. C. y Parsons, J. T. (2002). Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* 296, 1652-1653.
- Miller, P. G.; Al-Shahrour, F.; Hartwell, K. A.; Chu, L. P.; Jaras, M.; Puram, R. V.; Puissant, A.; Callahan, K. P.; Ashton, J.; McConkey, M. E.; Poveromo, L. P.; Cowley, G. S.; Kharas, M. G.; Labelle, M.; Shterental, S.; Fujisaki, J.; Silberstein, L.; Alexe, G.; Al-Hajj, M. A.; Shelton, C. A.; Armstrong, S. A.; Root, D. E.; Scadden, D. T.; Hynes, R. O.; Mukherjee, S.; Stegmaier, K.; Jordan, C. T. y Ebert, B. L. (2013). In Vivo RNAi Screening Identifies a Leukemia-Specific Dependence on Integrin Beta 3 Signaling. *Cancer Cell* 24, 45-58.
- Mitelman, F. (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 462, 247-253.
- Mitelman, F.; Mertens, F. y Johansson, B. (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 15 Spec No, 417-474.

- Mocsai, A.; Ruland, J. y Tybulewicz, V. L. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10, 387-402.
- Molina-Privado, I.; Rodriguez-Martinez, M.; Rebollo, P.; Martin-Perez, D.; Artiga, M. J.; Menarguez, J.; Flemington, E. K.; Piris, M. A. y Campanero, M. R. (2009). E2F1 expression is deregulated and plays an oncogenic role in sporadic Burkitt's lymphoma. *Cancer Res* 69, 4052-4058.
- Morton, L. M.; Turner, J. J.; Cerhan, J. R.; Linet, M. S.; Treseler, P. A.; Clarke, C. A.; Jack, A.; Cozen, W.; Maynadie, M.; Spinelli, J. J.; Costantini, A. S.; Rudiger, T.; Scarpa, A.; Zheng, T. y Weisenburger, D. D. (2007). Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood* 110, 695-708.
- Morton, L. M.; Wang, S. S.; Devesa, S. S.; Hartge, P.; Weisenburger, D. D. y Linet, M. S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107, 265-276.
- Motokura, T.; Bloom, T.; Kim, H. G.; Juppner, H.; Ruderman, J. V.; Kronenberg, H. M. y Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350, 512-515.
- Nakayama, I.; Murao, S.; Kitazawa, S.; Azumi, A.; Yamamoto, M. y Maeda, S. (2000). Activation of the TCL1 protein in B cell lymphomas. *Pathol Int* 50, 191-199.
- Narducci, M. G.; Pescarmona, E.; Lazzeri, C.; Signoretti, S.; Lavinia, A. M.; Remotti, D.; Scala, E.; Baroni, C. D.; Stoppacciaro, A.; Croce, C. M. y Russo, G. (2000). Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res* 60, 2095-2100.
- Ngan, E.; Northey, J. J.; Brown, C. M.; Ursini-Siegel, J. y Siegel, P. M. (2013). A complex containing LPP and alpha-Actinin mediates TGFbeta-induced migration and invasion of ErbB2-expressing breast cancer cells. *J Cell Sci*.
- Nilsson, K.; Giovanella, B. C.; Stehlin, J. S. y Klein, G. (1977). Tumorigenicity of human hematopoietic cell lines in athymic nude mice. *Int J Cancer* 19, 337-344.
- Osthus, R. C.; Karim, B.; Prescott, J. E.; Smith, B. D.; McDevitt, M.; Huso, D. L. y Dang, C. V. (2005). The Myc target gene JPO1/CDCA7 is frequently overexpressed in human tumors and has limited transforming activity in vivo. *Cancer Res* 65, 5620-5627.
- Packham, G. y Cleveland, J. L. (1995). c-Myc and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1242, 11-28.

- Pajic, A.; Spitkovsky, D.; Christoph, B.; Kempkes, B.; Schuhmacher, M.; Staeger, M. S.; Brielmeier, M.; Ellwart, J.; Kohlhuber, F.; Bornkamm, G. W.; Polack, A. y Eick, D. (2000). Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87, 787-793.
- Park, I.; Han, C.; Jin, S.; Lee, B.; Choi, H.; Kwon, J. T.; Kim, D.; Kim, J.; Lifirsu, E.; Park, W. J.; Park, Z. Y.; Kim do, H. y Cho, C. (2011). Myosin regulatory light chains are required to maintain the stability of myosin II and cellular integrity. *Biochem J* 434, 171-180.
- Pekarsky, Y.; Hallas, C. y Croce, C. M. (2001). Molecular basis of mature T-cell leukemia. *JAMA* 286, 2308-2314.
- Pekarsky, Y.; Koval, A.; Hallas, C.; Bichi, R.; Tresini, M.; Malstrom, S.; Russo, G.; Tschlis, P. y Croce, C. M. (2000). Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3028-3033.
- Petit, M. M.; Meulemans, S. M.; Alen, P.; Ayoubi, T. A.; Jansen, E. y Van de Ven, W. J. (2005). The tumor suppressor Scrib interacts with the zyxin-related protein LPP, which shuttles between cell adhesion sites and the nucleus. *BMC Cell Biol* 6, 1.
- Petit, M. M.; Meulemans, S. M. y Van de Ven, W. J. (2003). The focal adhesion and nuclear targeting capacity of the LIM-containing lipoma-preferred partner (LPP) protein. *J Biol Chem* 278, 2157-2168.
- Pratt, S. J.; Epple, H.; Ward, M.; Feng, Y.; Braga, V. M. y Longmore, G. D. (2005). The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration. *J Cell Biol* 168, 813-824.
- Prescott, J. E.; Osthus, R. C.; Lee, L. A.; Lewis, B. C.; Shim, H.; Barrett, J. F.; Guo, Q.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A. y Dang, C. V. (2001). A novel c-Myc-responsive gene, JPO1, participates in neoplastic transformation. *J Biol Chem* 276, 48276-48284.
- Pulvertaft, J. V. (1965). A Study of Malignant Tumours in Nigeria by Short-Term Tissue Culture. *J Clin Pathol* 18, 261-273.
- Qiao, Q.; Jiang, Y. y Li, G. (2013). Inhibition of the PI3K/AKT-NF-kappaB Pathway With Curcumin Enhanced Radiation-Induced Apoptosis in Human Burkitt's Lymphoma. *J Pharmacol Sci* 121, 247-256.
- Rabbitts, T. H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149.
- Rabbitts, T. H. (1998). The clinical significance of fusion oncogenes in cancer. *N Engl J Med* 338, 192-194.

- Rao, P. H.; Houldsworth, J.; Dyomina, K.; Parsa, N. Z.; Cigudosa, J. C.; Louie, D. C.; Popplewell, L.; Offit, K.; Jhanwar, S. C. y Chaganti, R. S. (1998). Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92, 234-240.
- Richter, J.; Schlesner, M.; Hoffmann, S.; Kreuz, M.; Leich, E.; Burkhardt, B.; Rosolowski, M.; Ammerpohl, O.; Wagener, R.; Bernhart, S. H.; Lenze, D.; Szczepanowski, M.; Paulsen, M.; Lipinski, S.; Russell, R. B.; Adam-Klages, S.; Apic, G.; Claviez, A.; Hasenclever, D.; Hovestadt, V.; Hornig, N.; Korbel, J. O.; Kube, D.; Langenberger, D.; Lawerenz, C.; Lisfeld, J.; Meyer, K.; Picelli, S.; Pischmarov, J.; Radlwimmer, B.; Rausch, T.; Rohde, M.; Schilhabel, M.; Scholtysik, R.; Spang, R.; Trautmann, H.; Zenz, T.; Borkhardt, A.; Drexler, H. G.; Moller, P.; MacLeod, R. A.; Pott, C.; Schreiber, S.; Trumper, L.; Loeffler, M.; Stadler, P. F.; Lichter, P.; Eils, R.; Koppers, R.; Hummel, M.; Klapper, W.; Rosenstiel, P.; Rosenwald, A.; Brors, B. y Siebert, R. (2012). Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44, 1316-1320.
- Rodig, S. J.; Vergilio, J. A.; Shahsafaei, A. y Dorfman, D. M. (2008). Characteristic expression patterns of TCL1, CD38, and CD44 identify aggressive lymphomas harboring a MYC translocation. *Am J Surg Pathol* 32, 113-122.
- Rollison, D. E.; Howlader, N.; Smith, M. T.; Strom, S. S.; Merritt, W. D.; Ries, L. A.; Edwards, B. K. y List, A. F. (2008). Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 112, 45-52.
- Rosenberg, C. L.; Wong, E.; Petty, E. M.; Bale, A. E.; Tsujimoto, Y.; Harris, N. L. y Arnold, A. (1991). PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9638-9642.
- Rowley, J. D. (1990). The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer* 65, 2178-2184.
- Said, J. W.; Hoyer, K. K.; French, S. W.; Rosenfelt, L.; Garcia-Lloret, M.; Koh, P. J.; Cheng, T. C.; Sulur, G. G.; Pinkus, G. S.; Kuehl, W. M.; Rawlings, D. J.; Wall, R. y Teitell, M. A. (2001). TCL1 oncogene expression in B cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B cell lymphoma. *Lab Invest* 81, 555-564.
- Sant, M.; Allemani, C.; Tereanu, C.; De Angelis, R.; Capocaccia, R.; Visser, O.; Marcos-Gragera, R.; Maynadie, M.; Simonetti, A.; Lutz, J. M. y Berrino, F. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116, 3724-3734.
- Schevzov, G.; Curthoys, N. M.; Gunning, P. W. y Fath, T. (2012). Functional diversity of actin cytoskeleton in neurons and its regulation by tropomyosin. *Int Rev Cell Mol Biol* 298, 33-94.

- Schiller, H. B.; Hermann, M. R.; Polleux, J.; Vignaud, T.; Zanivan, S.; Friedel, C. C.; Sun, Z.; Raducanu, A.; Gottschalk, K. E.; Thery, M.; Mann, M. y Fassler, R. (2013). beta1- and alphav-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat Cell Biol* 15, 625-636.
- Schwartz, M. A. y Ginsberg, M. H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4, E65-68.
- Shaffer, A. L.; Rosenwald, A. y Staudt, L. M. (2002). Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2, 920-932.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. y Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Stossel, T. P. (1994). The machinery of cell crawling. *Sci Am* 271, 54-55, 58-63.
- Stupack, D. G.; Puente, X. S.; Boutsaboualoy, S.; Storgard, C. M. y Cheresch, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155, 459-470.
- Tan, Y.; Demeter, M. R.; Ruan, H. y Comb, M. J. (2000). BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem* 275, 25865-25869.
- Taub, R.; Kirsch, I.; Morton, C.; Lenoir, G.; Swan, D.; Tronick, S.; Aaronson, S. y Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-7841.
- Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E. y Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Vanasse, G. J.; Concannon, P. y Willerford, D. M. (1999). Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 94, 3997-4010.
- Vartiainen, M. K. y Machesky, L. M. (2004). The WASP-Arp2/3 pathway: genetic insights. *Curr Opin Cell Biol* 16, 174-181.
- Vervenne, H. B.; Crombez, K. R.; Delvaux, E. L.; Janssens, V.; Van de Ven, W. J. y Petit, M. M. (2009). Targeted disruption of the mouse Lipoma Preferred Partner gene. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 368-373.
- Vervenne, H. B.; Crombez, K. R.; Lambaerts, K.; Carvalho, L.; Koppen, M.; Heisenberg, C. P.; Van de Ven, W. J. y Petit, M. M. (2008). Lpp is involved in Wnt/PCP signaling and acts together with Scrib to mediate convergence and extension movements during zebrafish gastrulation. *Dev Biol* 320, 267-277.

- Virgilio, L.; Lazzeri, C.; Bichi, R.; Nibu, K.; Narducci, M. G.; Russo, G.; Rothstein, J. L. y Croce, C. M. (1998). Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3885-3889.
- Vizmanos, J. L.; Agirre, X.; Calasanz, M. J.; Garcia, M. y Novo, F. J. (2000). [Genetic alterations in hematological neoplasias of lymphoid origin: implications for clinical practice]. *An Sist Sanit Navar* 23, 451-465.
- Whitfield, M. L.; Sherlock, G.; Saldanha, A. J.; Murray, J. I.; Ball, C. A.; Alexander, K. E.; Matese, J. C.; Perou, C. M.; Hurt, M. M.; Brown, P. O. y Botstein, D. (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* 13, 1977-2000.
- Wikman, H. y Kettunen, E. (2006). Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 6, 515-530.
- Willier, S.; Butt, E.; Richter, G. H.; Burdach, S. y Grunewald, T. G. (2011). Defining the role of TRIP6 in cell physiology and cancer. *Biol Cell* 103, 573-591.
- Willis, T. G. y Dyer, M. J. (2000). The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96, 808-822.
- Yi, J. y Beckerle, M. C. (1998). The human TRIP6 gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis. *Genomics* 49, 314-316.
- Zanet, J.; Pibre, S.; Jacquet, C.; Ramirez, A.; de Alboran, I. M. y Gandarillas, A. (2005). Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J Cell Sci* 118, 1693-1704.
- Zhang, H.; Chen, X.; Bollag, W. B.; Bollag, R. J.; Sheehan, D. J. y Chew, C. S. (2009). Lasp1 gene disruption is linked to enhanced cell migration and tumor formation. *Physiol Genomics* 38, 372-385.
- Zhang, Y.; Chen, M.; Venugopal, S.; Zhou, Y.; Xiang, W.; Li, Y. H.; Lin, Q.; Kini, R. M.; Chong, Y. S. y Ge, R. (2011). Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through $\alpha 5 \beta 1$ integrin depending on its physical state. *Cell Death Dis* 2, e153.

PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha tenido lugar la publicación de un artículo parcialmente relacionado con el trabajo presentado en esta memoria: ***"E2F4 plays a key role in Burkitt lymphoma tumorigenesis"***. Jiménez-P R*, Molina-Privado I*, Montes-Moreno S, Chiodo Y, Rodríguez-Martínez M, Sánchez-Verde L, Iglesias T, Piris MA, Campanero MR. *Leukemia* (2012) PMID: 22475873.

Parte del trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral se encuentra recogido en el artículo ***"CDCA7 is a central mediator of tumor transformation in lymphoid neoplasias"***. R. Jiménez-P, Y. Chiodo, N. Méndez-Barbero, R. Córdoba, T. Iglesias, Juan M. Redondo, MR Campanero. (**Manuscrito en preparación**)

